

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

Evaluación del efecto antimicrobiano de la lactoferrina bovina y sus derivados, y su combinación con altas presiones, sobre patógenos y alterantes de la carne y productos cárnicos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana del Olmo Sánchez

Director

Manuel Núñez Gutiérrez

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA
LACTOFERRINA BOVINA Y SUS DERIVADOS, Y SU COMBINACIÓN
CON ALTAS PRESIONES, SOBRE PATÓGENOS Y ALTERANTES DE
LA CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS**

Ana del Olmo Sánchez
Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA
LACTOFERRINA BOVINA Y SUS DERIVADOS, Y SU COMBINACIÓN
CON ALTAS PRESIONES, SOBRE PATÓGENOS Y ALTERANTES DE
LA CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS**

Memoria presentada por **Ana del Olmo Sánchez** para la obtención del grado
de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Director: Dr. Manuel Nuñez Gutiérrez
Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA

EL DOCTORANDO

VºBº DEL DIRECTOR

Manuel Núñez Gutiérrez, investigador A1, del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA,

CERTIFICA:

Que la Tesis doctoral titulada “Evaluación del efecto antimicrobiano de la lactoferrina bovina y sus derivados, y su combinación con altas presiones, sobre patógenos y alterantes de la carne y productos cárnicos” de la que es autora Ana del Olmo Sánchez, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 10 de Diciembre de 2011

Fdo. Manuel Núñez Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, Manuel Núñez, el haber confiado en mí y haber hecho posible este trabajo de investigación que aquí se presenta. Gracias por su apoyo, por su paciencia, por enseñarme tanto y por su dedicación a pesar de sus múltiples responsabilidades, primero como Director de Departamento y luego como Director del INIA. Porque nunca podrá imaginar cuánto significó para mí el momento en que me propuso realizar esta tesis doctoral.

Gracias también a Margarita Medina por su amabilidad, su apoyo continuo y su eterna sonrisa.

A Rocío y Rakel, mis dos "ratitas" del INIA, por su cariño, su amistad y por hacer estos años mucho más fáciles y felices. Y a todos mis compañeros del Departamento, por los momentos vividos día tras día: Pilar G, Tomi, Ana G, Juan, Chema, Joaquín, Iria, Nerea, María, Dani, Vicente, Blanca, Mercedes, Alejandro, David, Ángela, Olga, Natalia, Pilar L, Sagrario, Lucía, Sonia, Chiqui, Eva, Susana, Izaskun y Marta.

A mis antiguos compañeros de Veterinaria por tantos años compartidos, con especial cariño a Isabel C, Billy, Juan Miguel, Manuela, Lola, Marisa, Luis y Concha.

A mis amigos "casi virtuales", Rafa, Valdecasas, Ángela R, Mario, Arancha, Lydia, Concha M, Manolo S, Merce y Lukas, por seguir siéndolo aún en la distancia. A Johnny & Mary, Gabriel, Casi y Vlad, por vuestra alegría y por hacer más llevadero el día a día.

Por supuesto, a mis "incondicionales". A Charles, mi más querido amigo, por su coraje, su cariño y su bondad, por ser mi "ángel de la guarda" año tras año. A Elvira, por ser mi apoyo, mi alegría y mi tabla de salvación en momentos muy duros, ya pasados. A Manuel Reina, por su cariño, su entusiasmo, y por demostrarme que se puede ser un excelente profesional y una mejor aún persona.

A los amigos que se fueron, Eduardo C, Francisco, Alan, Melkor, Terry y Lorenzo, ojalá pudierais estar aquí.

A Javi, por su alegría, su cariño, su ayuda, su compañía, su eterna paciencia y su inmenso corazón. Por tantas cosas, porque sin ti me habría venido abajo.

A mi madre, por su apoyo y entrega en todo momento, en las rachas buenas y en las malas. Por estar siempre ahí, sin esperar ni pedir nada. Por observar, escuchar, comprender y ayudar, sin cuestionar nunca nada.

Y por supuesto, todo mi agradecimiento, respeto y cariño a Guillermo del Olmo de Mingo, el ser más excepcional, admirable e íntegro que jamás he conocido. Mi padre, mi amigo, mi cómplice, mi modelo y maestro en la vida y en el trabajo. Porque daría lo que fuera por tenerte aquí, porque cambiaría 10 tesis por 5 minutos contigo, por mirarte a los ojos y oír tu voz. Porque sin ti todo se hace cuesta arriba, todo es más feo y resulta más difícil no pensar que "todo es para nada".

Komm in mein Boot, ein Sturm kommt auf und es wird Nacht.
Wo willst du hin, so ganz allein treibst du davon.
Wer hält deine Hand, wenn es dich nach unten zieht.
Wo willst du hin, so uferlos die kalte See.
Jetzt stehst du da an der Laterne mit Tränen im Gesicht,
das Abendlicht verjagt die Schatten, die Zeit steht still und es wird Herbst.
Komm in mein Boot, die Sehnsucht wird der Steuermann.
Komm in mein Boot, der beste Seemann war doch ich.

T. Lindemann

Wichtig ist dass man nicht aufhört zu fragen.

A. Einstein

VIDA

Después de todo, todo ha sido nada,
a pesar de que un día lo fue todo.
Después de nada, o después de todo
supe que todo no era más que nada.

Grito <¡Todo!>, y el eco dice <¡Nada!>.
Grito <¡Nada!>, y el eco dice <¡Todo!>.
Ahora sé que la nada lo era todo,
y todo era ceniza de la nada.

No queda nada de lo que fue nada.
(Era ilusión lo que creía todo
y que, en definitiva, era la nada).

Qué más da que la nada fuera nada
si más nada será, después de todo,
después de tanto todo para nada.

J. Hierro

A Guillermo, siempre

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1	Introducción General	1
	Revisión Bibliográfica	5
1)	Tendencias de consumo, vida útil y alteraciones de los alimentos	5
2)	Bacterias alterantes y patógenas en alimentos	12
3)	Tecnologías de conservación de los alimentos	32
4)	Carne y productos cárnicos	42
5)	La lactoferrina	52
6)	Las altas presiones hidrostáticas	89
	Referencias	111
	Objetivos de la Tesis	167
Capítulo 2	Bactericidal effect of lactoferrin and its amidated and pepsin digested derivatives on <i>Pseudomonas fluorescens</i> : influence of environmental and physiological factors <i>J. Food Prot.</i> (2008) 71: 2468-2474	169
Capítulo 3	Bactericidal effect of lactoferrin and its amidated and pepsin digested derivatives against <i>Pseudomonas fluorescens</i> in ground beef and meat fractions <i>J. Food Prot.</i> (2009) 72: 760-765	179
Capítulo 4	Antimicrobial effect of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against <i>Salmonella</i> Enteritidis and <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>J. Dairy Sci.</i> (2010) 93: 3965-3969	187
Capítulo 5	Antimicrobial efficacy of lactoferrin, its amidated and pepsin-digested derivatives, and their combinations, on <i>Escherichia coli</i> O157:H and <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Lett. Appl. Microbiol.</i> (2010) 52: 9-14	195
Capítulo 6	Effect of lactoferrin and its derivatives against gram-positive bacteria <i>in vitro</i> and, combined with high pressure, in chicken breast fillets <i>Meat Science</i> (2012) 90: 71-76	203
Capítulo 7	Effect of lactoferrin and its derivatives, high hydrostatic pressure, and their combinations, on <i>Escherichia coli</i> O157:H7 and <i>Pseudomonas fluorescens</i> in chicken fillets <i>Inn. Food Sci. Emerg. Technol.</i> (in press)	211
Capítulo 8	Discusión General	219
Capítulo 9	Conclusiones Generales	251

Índice de Tablas

Tabla 1	Producción de carne en España de las principales especies cárnicas consumidas, entre los años 1990 y 2010.	46
Tabla 2	Producción en España para los principales productos cárnicos consumidos, entre los años 1997 y 2009.	47
Tabla 3	Localización y concentración de la lactoferrina en el organismo de mamíferos, en condiciones fisiológicas.	57
Tabla 4	Actividad microbicida observada <i>in vitro</i> (en condiciones de laboratorio) para la lactoferrina y algunos de sus derivados.	64
Tabla 5	Actividad antimicrobiana observada en diversos ensayos clínicos para la lactoferrina y algunos de sus derivados.	72
Tabla 6	Alimentos tratados por altas presiones comercializados en la actualidad.	106
Tabla 7	Rangos de eficacia bactericida <i>in vitro</i> de la LF y derivados.	222
Tabla 8	Eficacia bactericida de la LF y sus derivados en carne picada de ternera inoculada con <i>P. fluorescens</i> .	230
Tabla 9	Eficacia bactericida de la LF y sus derivados en filetes de pechuga de pollo inoculados con <i>P. fluorescens</i> .	230
Tabla 10	Eficacia bactericida de la LF y sus derivados en filetes de pechuga de pollo inoculados con <i>L. monocytogenes</i> .	231
Tabla 11	Eficacia bactericida de la LF y sus derivados en filetes de pechuga de pollo inoculados con <i>E. coli</i> O157:H7.	232
Tabla 12	Microbiota endógena de filetes de pollo: evolución durante el almacenamiento en refrigeración y efecto de las HHP.	237
Tabla 13	<i>L. monocytogenes</i> inoculada en pollo: evolución durante el almacenamiento en refrigeración y efecto de las HHP.	238
Tabla 14	<i>E. coli</i> O157:H7 inoculada en pollo: evolución durante el almacenamiento en refrigeración y efecto de las HHP.	239
Tabla 15	<i>P. fluorescens</i> inoculada en pollo: evolución durante el almacenamiento en refrigeración y efecto de las HHP.	240

Índice de Figuras

Figura 1	Ejemplos de productos de las distintas gamas alimentarias.	6
Figura 2	Estructura de la molécula de lactoferrina.	55
Figura 3	Productos de LF actualmente comercializados a través de internet, parafarmacias o farmacias.	81
Figura 4	Sistema discontinuo para la aplicación de altas presiones.	92
Figura 5	Sistema semicontinuo para la aplicación de altas presiones.	92
Figura 6	Ejemplos de productos RTE presurizados, actualmente comercializados.	105
Figura 7	Correlación entre cantidad de CPS y eficacia bactericida de AMILF para tres cepas de <i>P. fluorescens</i> y tres cepas de <i>S. Enteritidis</i> .	225

ABREVIATURAS

ACE	enzima convertidora de angiotensina
ADI	Ingesta diaria admisible
ADN	ácido desoxirribonucleico
ALF	lactoferrina activada
AM	antimicrobiano
AMILF	lactoferrina amidada
apoLF	apolactoferrina
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosín trifosfato
BHI	"Brain heart infusion"
bLF	lactoferrina bovina
BM1	"Basal medium 1"
BP	Baird Parker
CAMP	péptido catiónico antimicrobiano
CAP	envasado en atmósfera controlada
CAS	"Chemical Abstract Services"
CDM	"chemically defined medium"
CFC	"cetrimide, fucidin and cephalotin"
cLF	lactoferrina canina
CPS	polisacárido capsular
DFD	"dark, firm and dry"
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ECEH	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ECEI	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ECEP	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ECET	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
ECVT	<i>Escherichia coli</i> verocitotoxigénica
EDTA	ácido etilendiaminotetra-acético
EFSA	"European Food Safety Authority"
FDA	"Food and Drug Administration"
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
GAG	glucosaminoglicano
GAM	medio Gifu anaeróbico
GRAS	"generally recognized as safe"
HHP	"high hydrostatic pressure"
hLF	lactoferrina humana
holoLF	hololactoferrina
HPP	"high pressure processing"
HS	heparán sulfato
ID	intestino delgado
IL	interleucina
IP	intraperitoneal

KF	“Kenner fecal”
LAK	“Natural killers” activados por linfoquinas
LB	“Luria broth”
LF	lactoferrina
LFamp	lactoferrampina
LFC	lactoferricina
LFRs	receptores de lactoferrina
LPS	lipopolisacárido
LT	termolábil
MAP	envasado en atmósfera modificada
min	minutos
NGF	factor de crecimiento nervioso
NK	“natural killers”
NNP	nitrógeno no proteico
PBS-Tw	“phosphate buffer saline-Tween”
PDLF	lactoferrina digerida con pepsina
PEF	“pulsed electric fields”
pl	punto isoeléctrico
PSE	“pale, soft, exudative”
PYG	“peptone yeast glucose”
QPS	“qualified presumption safety”
rARN	ácido ribonucleico ribosomal
rhLF	lactoferrina recombinante humana
ROS	especies oxígeno reactivas
RTE	“ready-to-eat”
SD	Sabouraud’s dextrosa
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
SDS-PAGE	electroforesis en gel poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SLT	“shiga-like toxins”
SPYE	“special peptone yeast extract”
ST	termoestable
T ^a	temperatura
TLF	talactoferrina
TSB	“tryptic soy broth”
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TSYE	“tryptic soy yeast extract”
ufc	unidades formadoras de colonias
UHT	“ultra-high temperature”
USDA	“United States Department of Agriculture”
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
VRB	“violet red bile”

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA III
(HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS)

FACULTAD DE VETERINARIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA LACTOFERRINA BOVINA
Y SUS DERIVADOS, Y SU COMBINACIÓN CON ALTAS PRESIONES, SOBRE
PATÓGENOS Y ALTERANTES DE LA CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS**

RESUMEN de TESIS

Ana del Olmo Sánchez

Departamento de Tecnología de Alimentos

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid

Director: Dr. Manuel Núñez Gutiérrez, Departamento de Tecnología de Alimentos,
INIA, Madrid

Las tendencias actuales de consumo de alimentos han incrementado la demanda de productos mínimamente procesados y listos para el consumo, de fácil y rápida preparación, y larga vida útil. Esta demanda ha conducido a la búsqueda y desarrollo de métodos alternativos de conservación y procesado que permitan mantener las características nutricionales y organolépticas de los alimentos asegurando al mismo tiempo su calidad higiénico-sanitaria, al inhibir el crecimiento de microorganismos alterantes y de patógenos responsables de enfermedades transmitidas por alimentos. Frente a los métodos más tradicionales de conservación de alimentos, como la fermentación, el salado, la adición de conservantes químicos y el tratamiento térmico, se han desarrollado nuevas tecnologías alternativas de conservación o tecnologías emergentes, como la irradiación, los pulsos eléctricos, los ultrasonidos, el envasado en atmósferas modificadas, la adición de bioconservantes y las altas presiones hidrostáticas (HHP).

El sector cárnico en España constituye un sector de primera magnitud dentro de la Industria Alimentaria, representando más del 35% del gasto alimentario. La carne debido a sus especiales características, como alto contenido en nutrientes, valores de pH entre 5.6 y 6.0, y actividad de agua superior a 0.98, constituye un excelente medio de cultivo en el que prácticamente todos los microorganismos son capaces de crecer, siendo por lo tanto un alimento altamente perecedero, que puede vehicular microorganismos alterantes y patógenos.

En el presente trabajo de investigación nos hemos centrado en la aplicación de dos tecnologías emergentes, la adición de lactoferrina y sus derivados como bioconservantes y las altas presiones hidrostáticas, de cara al control de bacterias alterantes y patógenas en la carne y los productos cárnicos. La lactoferrina (LF) es una glicoproteína que está presente de forma natural en la leche y otras secreciones de los mamíferos. Diversos estudios indican que la LF y sus derivados ejercen un potente efecto antimicrobiano frente a bacterias, virus, parásitos, mohos y levaduras, además de otras actividades como compuesto anticancerígeno, antioxidante, antiinflamatorio, inmunoregulador y prebiótico, por lo que su incorporación en alimentos podría ser muy interesante. Las altas presiones hidrostáticas constituyen un método alternativo a la pasteurización térmica de los alimentos, que permite aumentar la seguridad microbiológica y alargar su vida útil, siendo ya múltiples los productos tratados con esta tecnología que se están comercializando. Las altas presiones podrían además actuar sinérgicamente con la LF y sus derivados, resultando potenciado el efecto bactericida de ambos tratamientos, por lo que se ha incluido en el trabajo de investigación el estudio de los tratamientos combinados.

De cara a la utilización de la LF bovina y sus derivados como bioconservantes en alimentos, se evaluó el **efecto bactericida en condiciones *in vitro*** (en tampón

Tris, durante 1 h a 30 °C) de distintas concentraciones de estos antimicrobianos (LF, su forma amidada o AMILF, su forma digerida con pepsina o PDLF, y su forma activada comercial o ALF) frente a distintas bacterias alterantes y patógenas, que pueden estar presentes en carne y productos cárnicos. La eficacia bactericida se calculó como el número de unidades logarítmicas en que se vieron disminuídos los niveles bacterianos por la presencia del antimicrobiano. Se observó un efecto bactericida de la LF y sus derivados dosis-dependiente, así como una gran variabilidad entre especies y cepas en la susceptibilidad a éstos. En general, se observó un mayor efecto bactericida para concentraciones altas (5-20 mg/ml) de LF y ALF, medias (1-2 mg/ml) de PDLF y bajas (< 1 mg/ml) de AMILF. Dentro de las bacterias gram negativas, presentó mayor susceptibilidad a estos antimicrobianos *Pseudomonas fluorescens*, especialmente la cepa ATCC948 (para la que se alcanzaron valores de eficacia bactericida de hasta casi 6 unidades logarítmicas), seguida de *Salmonella* Enteritidis (con valores de eficacia de hasta 3.4 unidades logarítmicas), y siendo *Serratia liquefaciens* y *Escherichia coli* O157:H7 las más resistentes (con valores de eficacia máxima de hasta 1.1 y 2.9 unidades logarítmicas respectivamente). Dentro de las bacterias gram positivas, fue *Listeria monocytogenes* la especie más sensible a estos antimicrobianos, especialmente la cepa CECT5725 (para la que se alcanzaron valores de eficacia bactericida de hasta 7.4 unidades logarítmicas), seguida de *Staphylococcus aureus* (con valores de eficacia de hasta 2.2 unidades logarítmicas), y siendo *Enterococcus faecalis* la especie más resistente (con valores de eficacia de hasta 1.9 unidades logarítmicas).

Para investigar en condiciones *in vitro* el efecto de distintos factores sobre la actividad bactericida de la LF y sus derivados, se fijó una concentración de antimicrobiano de 1 mg/ml y se escogió a *P. fluorescens* ATCC948 como microorganismo a ensayar. Se observó así la influencia de diversos factores dependientes del microorganismo, como carga y fase de crecimiento microbiano, factores dependientes del medio, como tampón, pH y presencia de cationes, y de factores dependientes del antimicrobiano, como tipo y concentración de antimicrobiano. Cabe destacar la gran influencia de los cationes sobre el efecto bactericida de la LF y sus derivados, de tal modo que concentraciones de K^+ a partir de 10 mM, de Na^+ a partir de 1 mM, y de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Fe^{3+} a partir de 0.1 mM, lograron disminuir sensiblemente el efecto bactericida, que resultó abolido para concentraciones de 1 mM de Fe^{3+} y para 10 mM de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} . Otro factor que también se investigó y que podría influir sobre el efecto bactericida de la LF y sus derivados en condiciones *in vitro* fue la presencia de polisacárido capsular (CPS). Se observó que la concentración de CPS estaría negativamente correlacionada

con la eficacia bactericida de la AMILF y la eficacia bactericida máxima alcanzada por la LF y sus derivados sobre tres cepas de *S. Enteritidis* y tres cepas de *P. fluorescens*.

Finalmente, se seleccionaron *E. coli* O157:H7 y *S. liquefaciens* como bacterias gram negativas altamente resistentes a la LF y sus derivados, para investigar en condiciones *in vitro* el posible efecto sinérgico del uso combinado de estos antimicrobianos. En contra de lo esperado, se observó que la combinación de AMILF con PDLF, y de los tres antimicrobianos (LF, AMILF y PDLF), dio lugar a una disminución del efecto bactericida global respecto a la suma de los ejercidos por los antimicrobianos individualmente (antagonismo), mientras que la combinación de LF con AMILF o PDLF causó una cierta potenciación del efecto bactericida (sinergismo), aunque tan sólo alcanzó un máximo de 0.56 unidades logarítmicas de reducción adicional para *E. coli* y de 0.38 unidades para *S. liquefaciens*. Por ello se descartó el uso combinado de los antimicrobianos como alternativa para potenciar su efecto bactericida.

Una vez evaluada la **actividad bactericida de la LF y sus derivados** en condiciones *in vitro* (en buffer), se pasó a su **evaluación en carne**, tanto en carne roja (ternera) como en carne blanca (pollo). Se observó que, a pesar del potente efecto bactericida ejercido por la LF y sus derivados frente a ciertos microorganismos en condiciones *in vitro*, dicho efecto se ve muy disminuído al emplear estos antimicrobianos en carne. Frente a *P. fluorescens* ATCC948, los antimicrobianos en concentración de 1 mg/ml alcanzaron *in vitro* valores de eficacia bactericida entre 1.85 y 6.35 unidades logarítmicas, mientras que en carne picada de ternera inoculada con este mismo microorganismo y usando una concentración equivalente de los antimicrobianos, éstos sólo alcanzaron valores máximos de eficacia bactericida de 0.39 unidades logarítmicas. De forma similar, concentraciones de 0.5 mg/ml de la LF y sus derivados lograron valores de eficacia bactericida *in vitro* frente a este mismo microorganismo entre 1.39 y 5.27 unidades logarítmicas, mientras que en filetes de pollo se alcanzó una eficacia máxima de tan sólo 0.75 unidades logarítmicas. Para *L. monocytogenes* CECT5725, los antimicrobianos *in vitro* en concentración de 0.5 y 5 mg/ml alcanzaron valores de eficacia bactericida entre 1.94-4.74 y 2.41-7.39 unidades logarítmicas respectivamente, mientras que incorporados en filetes de pechuga de pollo en concentración equivalente frente al mismo microorganismo, alcanzaron valores máximos de eficacia de tan sólo 0.32 y 0.27 unidades logarítmicas respectivamente. Frente a *E. coli* O157:H7, la LF y sus derivados en concentración de 0.5 mg/ml alcanzaron en condiciones *in vitro* valores de eficacia bactericida máxima de 2.34 unidades logarítmicas, mientras que en filetes de pechuga de pollo inoculadas con el mismo microorganismo concentraciones equivalentes de los antimicrobianos alcanzaron valores máximos de eficacia de tan sólo 0.59 unidades logarítmicas.

Se procedió entonces a investigar los factores que podrían ser responsables de esta pérdida de actividad bactericida de la LF y sus derivados en carne. Se evaluó el efecto bactericida de la LF, AMILF y PDLF en concentración de 1 mg/ml frente a *P. fluorescens* ATCC948 en homogenizado cárnico (dilución 1:10 de carne picada de ternera en agua bidestilada desionizada), así como en el homogenizado sometido a diálisis, en fracciones de distinto tamaño molecular obtenidas por filtrado del homogenizado ya dializado, y en el agua de diálisis. Se observó la pérdida de eficacia bactericida de la LF y sus derivados en el homogenizado y en el agua de diálisis, y su recuperación en el dializado y sus fracciones, por lo que se pensó en los cationes presentes en carne como responsables de la pérdida de eficacia bactericida. Se analizó entonces la presencia de cationes en el homogenizado cárnico, y por tanto en carne, observando que cationes como K^+ , Na^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} aparecen en carne en concentración muy superior a la capaz de afectar negativamente en condiciones *in vitro* a la actividad bactericida de la LF y sus derivados. Este efecto inhibitor de los cationes sobre los antimicrobianos se logró solventar en homogenizado cárnico mediante la adición de un quelante de cationes, el EDTA (5 mM), junto con bicarbonato sódico (5 mM). Sin embargo, esta alternativa (el uso combinado de los antimicrobianos con EDTA y bicarbonato) no resultó válida en carne, ni siquiera empleando concentraciones de EDTA de hasta 256 mM.

Otra alternativa que se investigó de cara a la recuperación o mejora de la actividad bactericida de la LF y sus derivados en carne fue la forma de aplicación del antimicrobiano, por si en esta pérdida de eficacia bactericida observada pudieran también estar implicados fenómenos de mala distribución del antimicrobiano en la carne. Se observó que la aplicación de la LF y sus derivados mediante inmersión de la pieza cárnica en la solución de antimicrobiano podría suponer una ligera mejora respecto a la aplicación habitual por adición del antimicrobiano a la carne y masajeado. Un paso adicional de lavado de la pieza cárnica, previo a la homogenización y siembra, por inmersión en una solución de cloruro sódico al 0.85% no supuso ninguna mejora. Sin embargo, la ligera mejora de la eficacia bactericida, inferior a 1 unidad logarítmica, lograda por la aplicación por inmersión posiblemente no compensaría la mayor complejidad y gasto de antimicrobiano y tiempo que supondría en caso de empleo en la industria.

Finalmente, se investigó el efecto del **uso combinado de la LF y sus derivados** en carne (pollo) junto con tratamientos de **altas presiones hidrostáticas**, frente a patógenos (*L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7) y alterantes (*P. fluorescens*), como alternativa para tratar de recuperar o potenciar el efecto bactericida de los antimicrobianos en carne. Como ya se ha indicado, la LF y sus derivados ejercieron escaso efecto bactericida en filetes de pechuga de pollo inoculados con *L.*

monocytogenes CECT5725, *E. coli* O157:H7 y *P. fluorescens* ATCC948. Sin embargo, las altas presiones (400 MPa durante 10 minutos a 10 °C) lograron por sí solas reducciones en la microbiota inoculada en pollo (en agar selectivo) próximas o superiores a 4 unidades logarítmicas, durante los 8 días de conservación en refrigeración post-presurización. Para la microbiota total del pollo (en agar TSYEA) se observó una importante recuperación a día 8 post-presurización, alcanzando niveles próximos o superiores a 6 log ufc/g. El uso combinado de la LF y sus derivados con las altas presiones supuso una mejora muy limitada de la eficacia bactericida de los antimicrobianos en pollo, frente a *L. monocytogenes* y *E. coli*. La aplicación de 400 MPa (10 min a 10 °C) en pollo inoculado con *L. monocytogenes* CECT5725, supuso una reducción adicional inducida por la LF y sus derivados de menos de 1 unidad logarítmica, durante todo el tiempo de almacenamiento en conservación a 5 °C post-presurización. Se observó además que este limitado efecto de las altas presiones sobre la eficacia bactericida de la LF y sus derivados es mayor cuando éstos se incorporan 18 horas antes o 1 hora después de la presurización que cuando se incorporan sólo 1 hora antes, lo cual no se correspondería con el fenómeno de “sensibilización transitoria” inducido por las altas presiones y ciertos antimicrobianos registrado por otros autores. Para pollo inoculado con *E. coli* O157:H7, el tratamiento de 200 MPa (10 min a 10 °C) tan sólo supuso una reducción adicional máxima inducida por la LF de 0.5 unidades logarítmicas inmediatamente tras la presurización, que se perdió durante el posterior almacenamiento en refrigeración. El tratamiento con 400 MPa (10 min a 10 °C) logró reducciones adicionales máximas inducidas por la LF y sus derivados de hasta 0.4-0.5 unidades logarítmicas a los 8 días post-presurización. Para pollo inoculado con *P. fluorescens* ATCC948, el tratamiento con 200 MPa (10 min a 10 °C) no supuso una mejora importante de la eficacia bactericida de la LF y sus derivados, que tan sólo indujeron reducciones adicionales máximas de 0.44 unidades logarítmicas. Presiones superiores lograron una cierta potenciación del efecto bactericida de los antimicrobianos frente a la microbiota inoculada (datos en agar CFC) en pollo, que sin embargo no se hizo patente para la microbiota total del pollo (datos en agar TSYE). Así, la presurización con 300 MPa (10 min a 10 °C) logró reducciones adicionales en los niveles en CFC inducidas por la LF y sus derivados de 1.1-2.4 unidades logarítmicas a los 8 días post-presurización. El tratamiento con 400 MPa (10 min a 10 °C) logró reducciones adicionales de los niveles en CFC inducidas por los antimicrobianos de hasta 0.6 unidades durante todo el almacenamiento post-presurización. Y para el tratamiento con 500 MPa (10 min a 10 °C) se observó que la presencia de los antimicrobianos logró mantener por debajo del límite de detección los niveles en CFC durante los 8 días de almacenamiento post-presurización.

Se puede concluir que el potente efecto bactericida ejercido por la LF y sus derivados en condiciones *in vitro* se ve muy reducido al emplear estos antimicrobianos en carne, por lo que su valor como bioconservantes resulta muy limitado. Por otro lado, el tratamiento con altas presiones hidrostáticas es capaz de ejercer un potente efecto bactericida en carne. La combinación de las altas presiones con la LF y sus derivados logra inducir una cierta mejora del efecto bactericida de estos antimicrobianos en carne, por lo que su uso combinado podría resultar interesante para mejorar el control de ciertos microorganismos, como el alterante *P. fluorescens*¹

Financiación para el desarrollo de la Tesis Doctoral:

La tesis doctoral se realizó en el marco de los siguientes proyectos:

- Título del proyecto: “Altas presiones y lactoferrina activada en la mejora de la seguridad de los productos cárnicos” (CPE 03-012-C3-1).

Entidad financiadora: INIA

Duración: 2004-2007

Investigador responsable: Manuel Núñez Gutiérrez

- Título del proyecto: “Tecnologías emergentes y procesado mínimo: aplicación a la seguridad química y microbiológica de alimentos listos para el consumo (RTE)” (S-0505/AGR/014).

Entidad financiadora: Comunidad de Madrid

Duración: 2006-2009

Investigador responsable: Manuel Núñez Gutiérrez

- Título del proyecto: “Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables” (CSD 2007-00016).

Entidad financiadora: Proyecto Carnisenusa, Programa Consolider

Duración: 2007-2012

Investigador responsable del Subproyecto: Manuel Núñez Gutiérrez

ESTRUCTURA DE LA TESIS

La presente tesis doctoral consta de los siguientes apartados:

- Una **Introducción** (Capítulo 1) redactada en español, que incluye una revisión bibliográfica sobre los alimentos (tendencias de consumo, alteraciones y tecnologías de conservación) y los **Objetivos** principales del trabajo de investigación.
- Seis **capítulos temáticos** (Capítulos 2 a 7) redactados en inglés y presentados en formato de publicaciones en revistas científicas, que constituyen el cuerpo de la tesis.
- Una **Discusión general** (Capítulo 8) y una sección de **Conclusiones** (Capítulo 9), redactadas en español.



Capítulo 1

Introducción General

Fotografía: *Pseudomonadaceae* endógenas del pollo en agar CFC.

En esta **Introducción** se han revisado los aspectos fundamentales en los que se basa la presente investigación. Está dividida en seis apartados principales:

- En el primer apartado se revisan de forma general las tendencias actuales de consumo y fabricación de alimentos, así como las principales causas de alteración de los alimentos.
- En el segundo apartado se describen las principales bacterias implicadas en alteraciones, intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias.
- En el tercer apartado se hace una revisión general de las tecnologías de conservación de los alimentos.
- El cuarto apartado se centra más específicamente en la carne y los productos cárnicos: producción, tendencias y alteraciones.
- En el quinto apartado se hace una revisión de la lactoferrina y sus derivados: estructura, actividades y aplicaciones.
- Finalmente, el sexto apartado se centra en las altas presiones hidrostáticas, empleadas en este trabajo de investigación, junto con la lactoferrina y sus derivados, al objeto de controlar el crecimiento microbiano en carne y productos cárnicos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1- TENDENCIAS DE CONSUMO, VIDA ÚTIL Y ALTERACIONES DE LOS ALIMENTOS

1.1- Generalidades.

En las últimas décadas la oferta alimentaria ha evolucionado considerablemente debido al desarrollo de nuevas tecnologías para la conservación de los alimentos, así como para su preparación o procesado y para su forma de comercialización y de presentación. Actualmente el consumidor es cada vez más exigente, demandando alimentos conservados de mejor calidad, similares a sus equivalentes frescos naturales, con buenas características nutricionales, saludables y que garanticen su seguridad alimentaria. La necesidad de producir alimentos siguiendo estos estrictos parámetros de calidad ha llevado al desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías de conservación alternativas a los métodos tradicionales, basados en su mayoría en tratamientos térmicos intensos para la inactivación de microorganismos y enzimas, que ocasionan la modificación de las características organolépticas y el valor nutricional de los alimentos. Por otro lado, el cambio en los estilos de vida (como la incorporación de la mujer al trabajo o la multiculturalidad), las nuevas formas de cocinar (tendencia a consumir alimentos crudos o con tiempos muy cortos de cocinado o preparación) y el incremento de la esperanza de vida (aumentando así un sector de la población denominado “de riesgo”, como ancianos e inmunodeprimidos), han dado lugar a un mayor riesgo de contaminación microbiana a través de los alimentos, aumentando también la preocupación por la seguridad alimentaria tanto entre las autoridades sanitarias como en el sector productivo y en los consumidores.

1.2- Gamas de productos. Conservación y presentación.

Las gamas alimentarias son actualmente una forma de clasificación de los alimentos, que hace referencia no sólo a su forma final de presentación, sino también a su forma de procesado y tratamiento de conservación. Actualmente los alimentos se clasifican en cinco gamas, aunque se empieza a hablar del desarrollo de una posible sexta gama. En la Figura 1 se recogen algunos ejemplos de las distintas gamas alimentarias, que a continuación se describen.

1.2.1- Primera gama.

Bajo esta denominación se incluyen todos los alimentos frescos y en estado natural (como frutas, verduras, huevos, leche, carnes, pescados y mariscos frescos) y

aquéllos sometidos a los tratamientos más tradicionales de conservación como salado, secado o fermentación (salazones, pasta deshidratada, lácteos).

1.2.2- Segunda gama.

Comprende las conservas, semiconservas y enlatados, es decir, productos que se han sometido a un tratamiento térmico para su conservación y se han envasado en recipientes adecuados, de lata o vidrio, herméticamente cerrados. Incluyen productos tales como conservas de pescado, mermeladas y frutas en almíbar.

1.2.3- Tercera gama.

Incluye los alimentos congelados y ultracongelados, es decir, vegetales, frutas, carnes, pescados y mariscos sometidos a conservación por baja temperatura, pero que requieren de su preparación y cocinado para ser consumidos.



Figura 1. Ejemplos de productos de las distintas gamas alimentarias. Primera gama (1) con alimentos frescos, salazones y deshidratados. Segunda gama (2) con conservas, semiconservas y enlatados. Tercera gama (3) con congelados y ultracongelados no pre-cocinados. Cuarta gama (4) con alimentos pre-elaborados sin tratamiento térmico. Quinta gama (5) con alimentos pre-cocinados que requieren un mínimo procesado o calentamiento para su consumo. Sexta gama (6) en desarrollo, que podría incluir alimentos irradiados, liofilizados y texturizados.

1.2.4- Cuarta gama.

Bajo esta denominación se incluyen los alimentos pre-elaborados pero que no han recibido ningún tratamiento térmico, envasados y listos para su consumo inmediato o tras un mínimo cocinado o procesado. Están envasados en bolsas, bandejas o tarrinas, bajo atmósfera protectora, y requieren refrigeración. Su periodo de caducidad es corto, de unos 7 a 10 días. En la actualidad se comercializan así una gran variedad de productos hortofrutícolas frescos, que han sido limpiados, cortados, picados o troceados, como lechuga, zanahoria, espinacas, apio, puerros, acelgas, tomate, cebolla, patata, y frutas como naranja, manzana o sandía, individuales o mezclados. Dentro del sector cárnico se están empezando a comercializar productos de cuarta gama presentados en envases con atmósfera protectora, por ejemplo en bandejas con la carne y la guarnición por separado, que requieren un cocinado posterior, tales como ternasco encebollado o costillas en salsa barbacoa.

1.2.5- Quinta gama.

Comprende alimentos ya cocinados, sometidos a un tratamiento térmico o pasteurización, elaborados y envasados, que sólo requieren un mínimo procesado o calentamiento para su consumo. Incluye productos envasados en atmósfera modificada o al vacío y refrigerados, y también productos ultracongelados pero ya elaborados y cocinados. Pertenecen a este grupo productos elaborados, como por ejemplo pizzas, lasañas, y diversos platos preparados como almejas en salsa, pulpo a la gallega, ventresca de bonito o pastel de cabracho.

Dentro de la cuarta y quinta gama, se engloban los alimentos “listos para el consumo” (RTE – “ready to eat”). Estos productos están definidos por la FDA (2009) como “aquellos productos presentados en una forma que es comestible sin preparación adicional para lograr la seguridad del alimento, aunque pueden ser sometidos a una preparación adicional por razones de sabor, estéticas, epicúreas, gastronómicas o culinarias. No se exige que el producto lleve instrucciones de manipulación segura ni otro etiquetado que indique que el producto debe ser cocinado o tratado de alguna forma por motivos de seguridad, y puede incluir productos cárnicos y de ave congelados”. Bajo esta denominación se incluyen productos de origen animal cocinados o pre-cocinados, embutidos crudo-curados (como fuet, chorizo y jamón curado) y productos cárnicos tratados por calor (como jamón cocido, fiambres y salchichas tipo frankfurt), así como productos de origen vegetal y productos de repostería que no requieren ningún cocinado previo a su consumo.

1.2.6- Sexta gama.

Se habla de una posible sexta gama de alimentos, que podría incluir alimentos tan diversos como productos irradiados, liofilizados, con ingredientes funcionales y productos texturizados. No obstante, aún se encuentra en su fase de desarrollo e investigación y se está estudiando además la forma de introducirlos en el mercado.

1.3- Vida útil, caducidad y alteraciones de los alimentos.

Las tendencias actuales de consumo han dado lugar al desarrollo de nuevas gamas alimentarias que, como se ha descrito anteriormente, están enfocadas hacia la obtención de productos de fácil y rápida preparación, manteniendo su calidad sensorial y nutritiva, prolongando su vida útil o durabilidad y garantizando la calidad higiénico-sanitaria. La vida útil o durabilidad de un producto se define como el periodo de tiempo desde la fabricación en que éste mantiene una calidad global satisfactoria y puede consumirse con totales garantías, evitando que llegue a ser sensorialmente inaceptable o que pueda suponer un riesgo para la salud. El límite de la vida útil de un producto puede expresarse mediante tres tipos de fechas registradas en el envase (RD 2058/1982, RD 1334/1999), aunque ciertos productos, como los vinos, bebidas alcohólicas con más de un 10% de alcohol, frutas y verduras frescas, vinagre, sal, azúcar, bollería y panadería de consumo en el día, caramelos, chicles y productos similares de confitería, no están obligados a mostrar ninguna de estas fechas de consumo. Dichas fechas se definen como:

- Fecha límite de venta. Es la última fecha en la que un producto puede ofrecerse a la venta al detalle, e implica que después de esta fecha exista un plazo razonable de almacenamiento en el hogar sin deterioro de sus características organolépticas ni sanitarias.
- Fecha de duración mínima, durabilidad mínima, consumo preferente o fecha óptima de consumo. Es la última fecha en que un producto, en condiciones correctas de manipulación y almacenamiento, conserva inalteradas sus características iniciales, aunque después de esta fecha el producto pueda ser satisfactorio durante un cierto tiempo. Se expresa mediante la leyenda “consumir preferentemente antes de”, seguida de “día” y “mes” para productos de duración inferior a 3 meses, “mes” y “año” para productos de duración entre 3 y 18 meses, y de “año” para productos de duración superior a 18 meses.
- Fecha de caducidad, límite de utilización, límite de consumo o fecha de expiración. Es la última fecha a partir de la cual el producto no se considera comercializable ni apto para el consumo. Se expresa mediante la leyenda

“fecha de caducidad”, y se emplea en productos perecederos en muy corto plazo.

La vida útil es pues el periodo de tiempo en que un producto permanece inalterado desde un punto de vista nutricional, organoléptico y sanitario. Para el Código Alimentario Español un alimento alterado es “todo alimento que durante su obtención, preparación, manipulación, transporte, almacenamiento o tenencia, y por causas no provocadas deliberadamente haya sufrido tales variaciones en sus caracteres organolépticos, composición química o valor nutritivo, que su aptitud para la alimentación haya quedado anulada o sensiblemente disminuida, aunque se mantenga inocuo” (RD 2484/1967). Las causas de alteración de los alimentos incluyen:

- Alteraciones por causas físicas, debidas a factores como:
 - La acción de la luz, que es un factor de oxidación y catalizador de reacciones químicas y bioquímicas.
 - La acción del calor. Se considera que entre 20 y 40 °C se aceleran en general todos los procesos de degradación, a partir de 40 °C se producen fenómenos de evaporación y desecación, a partir de 50 °C se produce el cambio de estado de algunas proteínas, y a temperaturas superiores a 100 °C se produce desnaturalización proteica, quemaduras y cambios de coloración.
 - La acción del frío. Produce congelación (quemaduras y cristalización), oxidación y enranciamiento, y decoloración o aparición de coloración anómala.
 - Humedad o, por el contrario, desecación.
- Alteraciones por causas químicas o enzimáticas, debidas a reacciones e interacciones como:
 - Las reacciones de pardeamiento enzimático, que provocan la transformación de compuestos fenólicos en polímeros coloreados, principalmente pardos o negros, por acción de la enzima polifenol oxidasa. Se produce en especial en frutas y legumbres, y se ve potenciada por manipulaciones como el pelado o triturado, y por golpeado.
 - El pardeamiento no enzimático se produce por las reacciones de condensación entre compuestos carbonilo y aminados, o por la degradación de compuestos con dobles enlaces conjugados a grupos carbonilo. Se producen así polímeros oscuros, alteraciones organolépticas y pérdidas del valor nutritivo. Este proceso se ve además acelerado por la temperatura, por ejemplo por la cocción o pasteurización.

- La lipólisis enzimática. Está mediada por lipasas y provoca la liberación de ácidos grasos, produciéndose el enranciamiento y la oxidación lipídica. Este proceso está además potenciado por la luz y los cationes metálicos.
- También se pueden producir decoloraciones debidas a la degradación de pigmentos como clorofilas o carotenos.

- Alteraciones microbianas.

Los alimentos pueden ser vehículo de diversos microorganismos y metabolitos microbianos. Según su procedencia se clasifican en microorganismos endógenos (ya presentes en los alimentos antes de su obtención) y exógenos (que llegan a los alimentos durante su obtención, transporte, industrialización, conservación o consumo). A continuación se describen más detalladamente las principales bacterias causantes de alteraciones en alimentos (sección 2.1) y las principales bacterias patógenas que pueden estar presentes en alimentos (sección 2.2), por estar centrado este trabajo de investigación en el control de bacterias en carne y productos cárnicos. No obstante, además de las bacterias, otros microorganismos como hongos, parásitos y virus pueden ser responsables de alteraciones alimentarias y patologías, como se describe brevemente a continuación.

Las levaduras y mohos toleran, en general, mejor que las bacterias las condiciones de baja actividad de agua y pH ácido, siendo alterantes típicos de alimentos como frutas, hortalizas, cereales y productos horneados, pudiendo también afectar a la carne y los productos cárnicos. Son responsables de ablandamientos y podredumbres debido a su gran capacidad proteolítica y lipolítica, como es el caso de *Penicillium* spp., así como de alteraciones en el aspecto y coloración, como es el caso de diversas especies de los géneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Thamnidium* y *Torulopsis*. Además, algunas especies de mohos son capaces de crecer sobre los alimentos y producir micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos que serán ingeridos con el alimento contaminado. Entre las principales micotoxinas se encuentran las aflatoxinas producidas por *Aspergillus* spp., responsables de alteraciones hepáticas y carcinogénicas, las ocratoxinas producidas por *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., altamente nefrotóxicas, hepatotóxicas, inmunosupresoras, carcinogénicas y teratogénicas, la zearalenona producida por *Fusarium* spp., con actividad estrogénica y anabolizante, las fumonisinas producidas por *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp., de acción carcinogénica, los alcaloides del ergot producidos por *Claviceps* spp. y *Neotyphodium* spp., causantes del ergotismo y de cuadros convulsivos, necróticos y abortos, la patulina producida por *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., de actividad carcinogénica, los tricotecenos producidos por *Fusarium* spp. y *Trichophytum* spp., causantes de alteraciones gastrointestinales, hemorrágicas,

inmunológicas, neurológicas e inflamatorias, la citroviridina producida por *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp. y *Eupenicillium* spp., causante de alteraciones cardíacas y circulatorias, el desoxivalenol producido por *Fusarium* spp., causante de alteraciones gastrointestinales, inmunológicas y neurológicas, la moniliformina producida por *Fusarium* spp, causante de alteraciones cardíacas y circulatorias, y los psoralenos producidos por *Sclerotinia* spp., causantes de alteraciones cutáneas.

Los parásitos pueden ser unicelulares, como los protozoos, y pluricelulares o metazoos, como los helmintos que a su vez se dividen en nematodos y platelmintos (cestodos y trematodos). No se multiplican en los alimentos, pero sí que pueden estar presentes en ellos. Sus formas infectivas pueden ser así ingeridas con el producto, dando lugar a muy diversas manifestaciones clínicas que abarcan desde un estado de portador asintomático, pasando por sintomatología gastrointestinal o reacciones alérgicas, hasta graves manifestaciones de diversa naturaleza y localización según el parásito implicado, carga infectiva y estado inmunitario del hospedador. Los parásitos que se transmiten a través de los alimentos y que con mayor frecuencia causan enfermedades en el hombre son, dentro de los protozoos, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*, responsables de coccidiosis intestinales, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* responsables de cuadros gastrointestinales como la amebiasis y giardiasis, y *Toxoplasma gondii* responsable de la toxoplasmosis. Dentro de los nematodos, los más frecuentemente implicados son *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura*, causantes de geohelmintiasis, *Trichinella spiralis*, causante de la triquinosis, y *Anisakis* spp., causante de anisakiasis o anisakidosis. Dentro de los platelmintos, se encuentran los trematodos como *Fasciola hepatica*, causante de fasciolosis, fasciolosis o distomatosis, y los cestodos como *Diphyllobothrium latum*, *Taenia saginata* y *Taenia solium*, causantes de teniasis y cisticercosis, y *Echinococcus granulosus*, causante de la hidatidosis o equinococosis.

Los virus tampoco se multiplican en los alimentos pero son muy resistentes y pueden estar presentes en ellos, principalmente por contaminación fecal directa o por aguas contaminadas, y ser ingeridos con el producto. Entre los principales virus causantes de enfermedades transmitidas por alimentos se encuentran el virus de la hepatitis A y E, así como virus entéricos responsables de trastornos gastrointestinales, como rotavirus, reovirus, adenovirus, calicivirus, norovirus o virus tipo Norwalk, astrovirus y coronavirus. Otros enterovirus que también pueden estar implicados pero cuya incidencia es baja en la actualidad son los echovirus y poliovirus de la familia *Picornaviridae*.

2- BACTERIAS ALTERANTES Y PATÓGENAS EN ALIMENTOS

2.1- Bacterias alterantes en alimentos.

Como ya se ha indicado, un alimento alterado puede no ser peligroso desde un punto de vista sanitario pero presenta modificaciones de sus características organolépticas, careciendo por tanto de la calidad debida. Entre las principales bacterias causantes de alteraciones alimentarias se encuentran:

2.1.1- Pseudomonas.

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pseudomonadales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Engloba bacilos pequeños, rectos o curvos, gram negativos, móviles, con flagelos peritricos, aerobios, no fermentadores, que metabolizan los azúcares por la vía de Entner-Doudoroff o del 2-cetodesoxiglucuronato y presentan una gran versatilidad metabólica. Dentro de este género destaca la especie *P. fluorescens*. Es una bacteria muy ubicua, presente en suelo y agua, así como en ambientes hospitalarios y alimentos como leche, carne, huevos y vegetales (Martínez Izquierdo *et al.*, 2001). Se denomina así porque es capaz de sintetizar y secretar un pigmento fluorescente hidrosoluble, la pioverdina, que actúa como sideróforo. Es psicrotrofa, con una temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 30 °C, aunque puede crecer en un amplio rango de temperaturas entre 5 y 42 °C, y a pH de entre 5 y 8, siendo su óptimo 7. Es capaz de sintetizar una abundante cápsula polisacáridica implicada en su adhesión, resistencia y formación de biofilms. Produce y secreta al medio enzimas hidrolíticas como proteasas y lipasas, muy termorresistentes. Puede crecer sobre los alimentos, incluso en refrigeración, y dar lugar a alteraciones como enverdecimiento, viscosidad y limo superficial, aparición de olores anómalos, amargor y gelificación (Borges Mano, 1997). Utiliza la glucosa como sustrato preferente y cuando ésta se agota comienza a degradar sustratos como aminoácidos, ácidos orgánicos y gluconatos dando lugar a la formación de sulfuros, ésteres, ácidos y aminas (Gill & Newton, 1977). Finalmente se van liberando otros compuestos como hidrocarburos, amoníaco y aminas como la putrescina, apareciendo limo superficial, aumentando el pH y desarrollándose el olor pútrido (Ingram & Dainty, 1971). En agar, *P. fluorescens* puede dar lugar al desarrollo de colonias de distinto aspecto (lisas, mucosas y rugosas). Una misma cepa puede dar lugar a colonias de distinto aspecto, apareciendo colonias parásitas, de pequeño tamaño, que se benefician de las colonias “normales” más abundantes, secuestrando el hierro y nutrientes de éstas (Ross-Gillespie *et al.*, 2007).

2.1.2. Acinetobacter.

El género *Acinetobacter* pertenece a la familia *Moraxellaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pseudomonadales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Este género engloba distintas especies de bacterias gram negativas, aerobios estrictos, no fermentadores de hexosas, inmóviles, no flagelados, saprófitos muy ubicuos y ampliamente distribuidos en la naturaleza, suelo, agua, así como en ambientes hospitalarios y alimentos. Su morfología es de tipo cocobacilar pero variable según el medio y fase de crecimiento. Tiene una gran capacidad de adaptación al medio, gran adhesividad y capacidad de colonización, así como gran resistencia a la desecación, a los antibióticos y a otras bacterias. Son bacterias saprófitas pero pueden actuar como patógenos oportunistas, especialmente en individuos inmunocomprometidos, pudiendo infectar heridas y causando infecciones respiratorias, urinarias y septicemia. Debido a su gran ubicuidad y presencia en suelo, superficies y agua, pueden contaminar alimentos como carne, pescados y vegetales. Pueden crecer sobre carne y productos cárnicos, degradando aminoácidos y ácidos orgánicos como el ácido láctico, y produciendo compuestos como ésteres, nitrilos y sulfuros, causando de este modo alteraciones del aspecto, textura y olor del alimento (Gill & Newton, 1977).

2.1.3- Psychrobacter.

El género *Psychrobacter* pertenece a la familia *Moraxellaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pseudomonadales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Incluye distintas especies de bacterias gram negativas, cocoides o cocobacilos, que suelen aparecer en parejas, inmóviles, no flagelados, aerobios estrictos y moderadamente halotolerantes. Son psicrófilos y saprófitos, habitantes del suelo, sedimentos y aguas, pudiendo así contaminar alimentos como lácteos, pescados y carnes (Páčová *et al.*, 2001). *P. immobilis* es la especie más importante de este género y la más frecuentemente aislada de alimentos y de ciertas infecciones oportunistas en humanos. No es un microorganismo proteolítico pero sí lipolítico, que puede verse implicado en alteraciones de los alimentos anteriormente citados, pudiendo además crecer en condiciones de refrigeración y en presencia de sal.

2.1.4- Serratia.

El género *Serratia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Este género engloba bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, móviles, con flagelos peritricos. Son capaces de fermentar azúcares como la glucosa, sin producción de gas, y son fermentadores lentos de la lactosa. Son

capaces de crecer en presencia de sales biliares, y pueden aprovechar el citrato y muy diversos compuestos como fuente de carbono. Son psicrotrofos, pero crecen en un amplio rango de temperaturas entre 5 y 40 °C, así como en un amplio rango de pH entre 5 y 9. Son bacterias ubicuas, presentes en suelo, agua y vegetales. Son saprófitos pero pueden actuar como patógenos oportunistas, principalmente en individuos inmunocomprometidos, dando lugar a procesos como endocarditis, osteomielitis, meningitis, infecciones oculares, cutáneas y de heridas, respiratorias y urinarias, y septicemia. Tienen un alto potencial patogénico y una gran resistencia a los antibióticos mediada por plásmidos. Pueden contaminar y alterar alimentos, como productos cárnicos, pescados y lácteos. Crecen en refrigeración y generan múltiples enzimas como DNAsas, lipasas, proteasas, gelatinasas, lecitinasas, quitinasas y esterases, alterando textura, aspecto y olor de los alimentos. *S. marcescens*, *S. rubidaea* y algunas cepas de *S. plymuthica* son capaces de sintetizar un pigmento rojo tripirrólico, la prodigiosina, alterando así el aspecto y color de los alimentos.

2.1.5- Enterobacter.

El género *Enterobacter* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Este género incluye una gran diversidad de especies de bacilos gram negativos, móviles, con flagelos peritricos, anaerobios facultativos, que pueden presentar cápsula. Son fermentadores de azúcares y producen gas, pero no sulfhídrico. Son saprófitos ubicuos, que pueden estar presentes en suelo, superficies, agua, materia orgánica y forman parte de la microbiota habitual de piel y tracto gastrointestinal de aves, mamíferos e invertebrados, pero pueden actuar como patógenos oportunistas, principalmente en individuos inmunocomprometidos y en niños, causando infecciones cutáneas y de heridas, endocarditis, meningitis, infecciones urinarias y respiratorias, alteraciones gastrointestinales, y septicemia. Debido a su amplia distribución pueden contaminar alimentos y en muchos casos se emplean como indicadores de contaminación fecal, pudiendo estar presentes en lácteos, productos cárnicos y de pescado, conservas y vegetales. En productos envasados al vacío o en atmósferas modificadas y con pH inferior a 5.8, pueden llegar a constituir una parte importante de la microbiota total al no existir microbiota competitiva, pudiendo causar alteraciones. Utilizan la glucosa, y en menor grado la glucosa-6-fosfato, aminoácidos y ácido láctico, generando sulfuros y aminas, y dando lugar a olores y aspecto anómalos (McMeekin, 1982).

2.1.6- *Hafnia*.

El género *Hafnia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007), y engloba a una única especie, *H. alvei*, anteriormente clasificada como *Enterobacter alvei* o *E. aerogenes* subsp. *hafniae* (Ewing & Fife, 1968). Incluye bacilos gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, móviles. Reducen los nitratos, son decarboxilasa positivos y capaces de aprovechar el citrato como única fuente de carbono. Son fermentadores de azúcares y glicerol, aunque de lactosa, y producen gas. Al igual que el género *Enterobacter* son saprófitos ubicuos, presentes en agua, suelo, materia orgánica, así como piel y tracto gastrointestinal de vertebrados e invertebrados, y pueden actuar también como patógenos oportunistas en individuos inmunocomprometidos, causando infecciones cutáneas y de heridas, infecciones gastrointestinales, urinarias y respiratorias, meningitis y septicemia. Pueden contaminar alimentos, como lácteos, productos cárnicos y de pescado, miel y conservas, causando alteraciones principalmente en productos envasados a vacío o en atmósfera modificada, dando lugar a la producción de gas por la fermentación de azúcares, acidificación del producto, y alteración del aspecto, olor y textura.

2.1.7- *Shewanella*.

El género *Shewanella* pertenece a la familia *Shewanellaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Alteromonadales* y phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Este género incluye bacilos largos gram negativos, móviles, flagelados, no esporulados, mayoritariamente mesófilos pero también hay cepas psicrófilas, psicrófilas y barófilas. Requieren para su crecimiento altos valores de actividad de agua, son sensibles a pH ácido, y halotolerantes. Son anaerobios facultativos, fermentadores variables de los azúcares, y productores de gas y sulfhídrico. Son saprófitos ubicuos, presentes en agua, suelo y hábitats acuáticos y marinos, aunque en ocasiones pueden actuar como patógenos de animales acuáticos, e incluso causar infecciones cutáneas y de tejidos blandos en humana. Pueden contaminar alimentos, principalmente productos cárnicos y de pescado. Son capaces de crecer en alimentos con pH superior a 6, como las carnes DFD (“dark, firm and dry”), y condiciones como baja disponibilidad de oxígeno (como en productos envasados en atmósferas modificadas) que favorecen su proliferación al eliminar a la microbiota competidora. *S. putrefaciens* es la especie más frecuentemente implicada en la alteración de los alimentos, que actúa en aerobiosis de forma similar al género *Pseudomonas* (degradando glucosa y aminoácidos, y produciendo sulfuros volátiles), y en anaerobiosis produce gran cantidad de sulfhídrico. Da lugar a la alteración de la

textura, color (color verdusco u oscurecimiento) y aparición de olores anómalos como a “estropajo usado” o “trapo sucio húmedo” en los alimentos.

2.1.8- Aeromonas.

El género *Aeromonas* pertenece a la familia *Aeromonadaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Aeromonadales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Este género incluye bacilos gram negativos, móviles, con un flagelo polar (excepto *Aeromonas salmonicida* y *A. media*), anaerobios facultativos, mesófilos o psicrotrofos. Son fermentadores de la glucosa y fermentadores variables de otros azúcares, y producen gas y sulfuros volátiles, y bajo ciertas condiciones, sulfhídrico. Son capaces de expresar una gran diversidad de factores de virulencia como fimbrias, adhesinas y lecitinas, hemolisinas, DNAsas, proteasas, lipasas y fosfolipasas, y enterotoxinas. Son bacterias ubicuas, presentes principalmente en hábitats acuáticos. Algunas especies son patógenos de peces y anfibios (como *A. salmonicida* y *A. hydrophila*), y pueden actuar como patógenos oportunistas, especialmente en individuos inmunocomprometidos, causando infecciones cutáneas, oculares y de heridas, infecciones respiratorias, gastroenteritis, meningitis, osteomielitis y septicemia (Abbott *et al.*, 2003). Debido a su ubicuidad y presencia en agua pueden contaminar alimentos como carnes y pescados, bebidas y vegetales. Compiten mal con otra microbiota pero su crecimiento se ve favorecido en condiciones de refrigeración y bajas tensiones de oxígeno, como productos cárnicos y de pescado envasados a vacío o en atmósferas modificadas, pudiendo ser causa de alteraciones y con un gran potencial patógeno. Pueden llegar a formar parte importante de la microbiota alterante de carne refrigerada de modo inadecuado, sobre todo de aves.

2.1.9- Xanthomonas.

El género *Xanthomonas* pertenece a la familia *Xanthomonadaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Xanthomonadales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Este género incluye bacilos gram negativos, móviles, con un flagelo polar, y no esporulados. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 25 y 30 °C, pero pueden crecer a temperatura de refrigeración. Son quimiorganotrofos, capaces de aprovechar como fuente de carbono una gran variedad de azúcares, carbohidratos y ácidos. Son aerobios estrictos, de metabolismo exclusivamente oxidativo. Sintetizan pigmentos carotenoides no hidrosolubles, y pueden secretar abundante exopolisacárido (xantano) implicado en su virulencia, resistencia y patogenicidad. Son bacterias ubicuas, habitantes del suelo, patógenos y alterantes de vegetales, siendo capaces de causar enfermedades en vegetales como el cancro, necrosis, manchas,

defoliación y obstrucción de vasos. Sin embargo, en algunos casos se han encontrado además formando parte de la microbiota alterante de canales y carnes.

2.1.10- *Alcaligenes*.

El género *Alcaligenes* pertenece a la familia *Alcaligenaceae*, clase *Betaproteobacteria*, orden *Burkholderiales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Este género incluye bacilos cortos o cocobacilos, gram negativos, aerobios estrictos, móviles, con flagelos peritricos. Su temperatura óptima varía entre 20 y 37 °C, aunque existen cepas psicrotrofas. Tienen actividad aminoacilasa, y no fermentan azúcares ni producen ácidos. Su nombre procede de su capacidad para generar álcalis a partir de sales orgánicas y amidas. Son saprófitos ubicuos, presentes en suelo, agua, y pueden formar parte de la microbiota gastrointestinal y cutánea de vertebrados. En algunas ocasiones pueden actuar como patógenos oportunistas en individuos inmunocomprometidos, causando infecciones respiratorias y urinarias. Pueden también contaminar superficies y alimentos, alterando principalmente canales, carne y productos cárnicos, lácteos y huevos. Son productores de lipasas, y pueden alterar el pH, aspecto, textura (gelificación) y olor de los alimentos.

2.1.11- *Brochothrix*.

El género *Brochothrix* pertenece a la familia *Listeriaceae*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, phylum *Firmicutes* (Garrity *et al.*, 2007). Está formado por bacilos gram positivos, no esporulados, no encapsulados, inmóviles, no flagelados, aerobios o anaerobios facultativos. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 20 y 25 °C, pero puede crecer a temperaturas de entre 0 y 30 °C. Toleran un amplio rango de pH, así como bajos valores de actividad de agua, y son capaces de crecer en presencia de sal en concentraciones de hasta un 6.5 %. Son saprófitos psicrotrofos presentes en suelo y agua, que pueden contaminar alimentos como carnes, pescados y lácteos, incluso productos en salazón. Tienen una gran capacidad alterante, y pueden llegar a constituir la parte mayoritaria de la microbiota alterante de productos cárnicos envasados en atmósferas modificadas, especialmente *B. thermosphacta* (Gill, 1996). Son capaces de utilizar la glucosa, y en menor grado el glutamato, como fuente de energía. En condiciones de aerobiosis generan en alimentos compuestos como el ácido acético, acetoina, diacetilo y ácidos grasos volátiles como el isobutírico e isovalérico, dando lugar a olores dulzones. En condiciones de anaerobiosis generan principalmente ácido láctico, etanol y en pequeña cantidad, ácidos grasos volátiles (Dainty & Hibbar, 1980). Además presentan actividad proteolítica, pudiendo así alterar la textura del producto y generar olores desagradables.

2.1.12- Flavobacterium.

El género *Flavobacterium* pertenece a la familia *Flavobacteriaceae*, clase *Flavobacteria*, orden *Flavobacteriales*, phylum *Bacteroidetes* (Garrrity *et al.*, 2007). Incluye bacilos gram negativos, no esporulados, no flagelados pero móviles por deslizamiento (aunque algunas especies pueden presentar flagelos peritricos), aerobios facultativos, y productores de pigmentos amarillos o naranjas. Son microorganismos quimiorganotrofos, fermentadores débiles de azúcares, con escasa producción de ácidos. Engloba bacterias mesófilas pero también psicrotrofas o psicrófilas, incluso habitantes de zonas polares, y muchas son halotolerantes. Son bacterias ubicuas, presentes en suelo, superficies y aguas, y en muchos casos intervienen en procesos de remineralización del suelo. Algunas especies, como *F. psychrophilum*, son patógenos de peces, causando infecciones cutáneas, necrosis y septicemia, como por ejemplo en la “enfermedad del agua fría”. Pueden también actuar como patógenos oportunistas en individuos inmunocomprometidos y niños, causando meningitis, infecciones oculares y cutáneas o de heridas. Son productores de lipasas, proteasas, fosfolipasas y lecitinasas, pudiendo contaminar y alterar alimentos, como lácteos, carne y productos cárnicos.

2.1.13- Micrococcus.

El género *Micrococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, phylum *Actinobacteria* (Garrrity *et al.*, 2007). Este género incluye cocos gram positivos, que suelen aparecer formando tétradas, no esporulados, aerobios estrictos o facultativos, móviles e inmóviles. Presentan una gruesa pared bacteriana, son muy resistentes a la temperatura, toleran bajos valores de actividad de agua y altas concentraciones de sal, llegando algunas especies a soportar hasta un 15%. *M. radiodurans* es además altamente resistente a las radiaciones gamma y ultravioleta. Son saprófitos ubicuos presentes en el agua, suelo, aire e incluso piel, y pueden actuar como patógenos oportunistas en individuos inmunocomprometidos, causando infecciones cutáneas y respiratorias, endocarditis, meningitis y septicemia. Pueden contaminar alimentos, como lácteos, productos cárnicos y de pescado, e incluso salmueras y curados (Huis In't Veld, 1996). Son catabólicamente muy versátiles, capaces de reducir los nitratos y de emplear un amplio rango de sustratos inusuales como piridina, bifenilos e hidrocarburos. Producen enzimas extracelulares como proteasas, lipasas y decarboxilasas pudiendo alterar la textura del alimento, y dando lugar al desarrollo de olores desagradables por la formación de cadaverina y putrescina por decarboxilación. Pueden producir limosidad superficial, acidificación del producto, e incluso cambios de coloración en el caso de *M. luteus* (amarillo) y *M. roseus* (rojizo).

2.1.14- Bacterias lácticas.

Bajo este nombre se incluyen muy diversas bacterias, todas ellas resistentes a pH ácido, estrictamente fermentativas y productoras de ácido láctico. Incluye seis familias (*Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*) pertenecientes a la clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, phylum *Firmicutes* (Garrity *et al.*, 2007). Este grupo engloba por tanto bacterias muy diversas, cocos o bacilos, gram positivos, no esporulados, generalmente inmóviles, anaerobios facultativos o microaerófilos, y carentes de citocromos. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 30 y 40 °C, pero pueden crecer en un rango de temperaturas entre 2 y 53 °C. Son microorganismos estrictamente fermentativos, y en función de los productos finales se clasifican en homofermentativos (cuando su producto final mayoritario es el ácido láctico, por encima de un 80%) y heterofermentativos (además de ácido láctico producen cantidades importantes de otros compuestos como ácido acético, dióxido de carbono o etanol). Son ubicuos, presentes en agua, suelos y materia orgánica, y muchos forman parte de la microbiota habitual de piel y tracto gastrointestinal de vertebrados. Al ser capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de carbohidratos y de productos de degradación proteicos, con bajas tensiones de oxígeno y bajo pH, resultan muy competitivos frente a otras bacterias. Diversas cepas seleccionadas se emplean en la industria alimentaria como cultivos iniciadores o estárter, por ejemplo en productos lácteos y embutidos. Otras cepas son capaces de producir bacteriocinas, pudiendo emplearse así como bioconservantes. Además algunas bacterias lácticas pueden verse implicadas en alteraciones de los alimentos. Así por ejemplo, en carne las bacterias lácticas constituyen una muy pequeña proporción de la microbiota alterante presente inicialmente, pero pueden convertirse en la microbiota predominante en productos cocidos y en productos envasados al vacío o en atmósferas modificadas (Pierson *et al.*, 1970). Son capaces de degradar la glucosa generando ácido láctico y ácidos grasos volátiles, y una vez agotada la glucosa pueden degradar aminoácidos generando compuestos azufrados volátiles y aminas, dando así lugar a olores y sabores ácidos, agrios o rancios, exudado, limosidad, acidificación e hinchamiento de envases por producción de gas (Gill & Newton, 1977; Labadie, 1999).

2.2- **Bacterias patógenas en alimentos.**

Cuando lo que se ve afectado es la seguridad higiénico-sanitaria de un producto, independientemente de que se vean afectadas o no sus características organolépticas, se habla de enfermedades transmitidas o vehiculadas por alimentos. Éstas habitualmente se clasifican como infecciones o intoxicaciones alimentarias,

aunque la distinción es en ocasiones imperfecta. Las infecciones alimentarias implican la presencia de microorganismos viables en el alimento en el momento de su consumo, y es tras la colonización y crecimiento en el organismo del hospedador cuando se desarrolla el proceso patológico. Las intoxicaciones alimentarias implican la presencia de sustancias tóxicas (toxinas bacterianas) en el alimento, las cuales son producidas por microorganismos que pueden o no estar presentes en el alimento en el momento de su consumo. A continuación se describen más en detalle las principales bacterias causantes de toxiinfecciones alimentarias.

2.2.1- Listeria monocytogenes.

El género *Listeria* pertenece a la familia *Listeriaceae*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, phylum *Firmicutes* (Garrity *et al.*, 2007). *L. monocytogenes* es la única especie implicada en patología humana, e incluye bacilos cortos o cocobacilos, a veces algo curvados, gram positivos (aunque los cultivos viejos se tiñen mal), no esporulados, no encapsulados, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos, móviles a 22-28 °C pero inmóviles a 37 °C. Son parcialmente hemolíticos, fermentan la glucosa y son fermentadores variables de otros azúcares, produciendo ácidos pero no gas ni sulfhídrico. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37 °C, pero pueden crecer en un rango de temperaturas entre 0.4 y 45 °C. Pueden crecer en un amplio rango de pH entre 4.5 y 9.2, el valor limitante de actividad de agua para su crecimiento es de 0.93, soportan la congelación y toleran altas concentraciones de sal (hasta un 25%). Entre sus factores de virulencia se encuentran los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), las betahemolisinas citolíticas (listeriolisinas) y su capacidad lipolítica, siendo además capaz de crecer en el interior de las células fagocíticas mononucleares, escapando al sistema inmune del hospedador.

Es un microorganismo saprófito ubicuo, ampliamente distribuido en la naturaleza, como en suelo, aguas, vegetales, materia orgánica y animales, y puede formar parte de la microbiota intestinal normal de hasta un 10% de la población. Puede contaminar una amplia variedad de alimentos como leche y lácteos, vegetales, carne y productos cárnicos, pescados, mariscos y ovoproductos, tanto frescos como procesados y RTE, dando lugar a la listeriosis. La dosis infectiva en alimentos es de 10^3 - 10^5 ufc/g, y son especialmente susceptibles los bebés, individuos inmunocomprometidos, ancianos y mujeres embarazadas. En adultos puede cursar de forma intestinal casi asintomática o pseudogripal, pero también puede dar lugar a otros procesos como meningitis, encefalitis, endocarditis, trastornos respiratorios y septicemia, con una mortalidad de hasta un 30%. En embarazadas puede cursar como un cuadro pseudogripal, que si no se trata desemboca en amnionitis, infección fetal y granulomatosis infantiséptica, dando lugar a abortos, mortinatos y partos prematuros

de neonatos infectados, constituyendo un proceso muy grave con una mortalidad fetal ó neonatal próxima al 100%. También se han descrito casos de listeriosis localizadas en personas con estrecho contacto con animales (veterinarios, personal de matadero y ganaderos), produciéndose afecciones localizadas cutáneas y oculares (Roberts *et al.*, 1996).

2.2.2- *Salmonella*.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Este género se divide en dos especies que son *S. enterica*, con seis subespecies, y *S. bongori*, con una sola subespecie (Brenner *et al.*, 2000). La subespecie *enterica* de *Salmonella enterica* incluye 1454 serotipos responsables del 80% de los casos de enfermedades transmitidas por alimentos. Esta subespecie engloba bacilos gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, móviles con flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum* y *S. pullorum*), no esporulados, y algunos serotipos presentan cápsula. Reducen los nitratos y fermentan azúcares, aunque no la lactosa, produciendo ácidos, gas y sulfhídrico. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35-43 °C, pero pueden crecer en un rango de 5 a 47 °C. Su pH óptimo varía es de 7.0-7.5 pero pueden crecer en un rango entre 3.8 y 9.0, y su valor limitante de actividad de agua es 0.94. Entre sus factores de virulencia se encuentran el antígeno somático (O) de la pared bacteriana, el antígeno flagelar (H), el antígeno Vi o antígeno capsular termolábil, citotoxinas responsables de necrosis local y una enterotoxina, similar a la toxina colérica, causante de enteritis y diarrea.

Son patógenos ubicuos, presentes en el suelo, agua, y tracto gastrointestinal de hombre y animales como comensal o patógeno (Roberts *et al.*, 1996). Los principales alimentos implicados en casos de infección por *Salmonella* son huevos, ovoproductos y carne fresca de aves y cerdo, además de otros alimentos como productos cárnicos, moluscos, crustáceos, frutas y hortalizas, y productos RTE (EFSA, 2011). La salmonelosis está causada por la ingestión de alimentos en los que el microorganismo se ha multiplicado. La dosis mínima infectiva varía entre 20 y 10⁹ ufc/g según el serotipo, alimento y huésped, y da lugar a las fiebres tifoideas y paratíficas. El cuadro clínico cursa con fiebre entérica, gastroenteritis y bacteriemia. La sintomatología aparece a las 12-48 horas tras la ingesta, y cursa con náuseas, vómitos, diarrea y dolor cólico abdominal. El proceso suele remitir en una semana, pero pueden aparecer complicaciones extraintestinales como meningitis, pericarditis, osteomielitis, neumonía, cistitis y septicemia. Pueden aparecer también portadores asintomáticos, sanos pero importantes desde el punto de vista de la diseminación del microorganismo (Pascual Anderson, 1989).

2.2.3- Staphylococcus aureus.

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, phylum *Firmicutes* (Garritty *et al.*, 2007). *S. aureus* es la especie más virulenta, y además de infecciones sistémicas y locales, como abscesos, infecciones cutáneas y de heridas, necrosis epidérmica tóxica, síndrome del shock tóxico y enterocolitis necrotizante del recién nacido, puede ocasionar la intoxicación alimentaria estafilocócica (Jablonski & Bohach, 1997). Esta especie incluye cocos gram positivos, que se agrupan formando racimos, no esporulados, inmóviles, no flagelados, aerobios y anaerobios facultativos, y algunas cepas presentan cápsulas viscosas. Reducen los nitratos y fermentan azúcares, produciendo ácidos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37 °C, pero pueden crecer en un rango entre 6 y 46 °C. Pueden crecer en un rango de pH entre 4.2 y 10, siendo su pH óptimo 7.0-7.5, y en un rango de actividad de agua de 0.83 a 0.99, soportando bien la desecación así como altas concentraciones de sal (hasta un 10%). Su nombre se debe al pigmento amarillo, no difusible y de naturaleza carotenoide, que se produce bajo ciertas condiciones como aerobiosis y crecimiento sobre medios sólidos o semisólidos. Entre sus factores de virulencia se encuentran las hemolisinas o enterotoxinas termolábiles (alfa, beta, gamma y delta), la exotoxina exfoliativa o epidermolítica o exfoliatina, las leucocidinas citotóxicas, las exotoxinas pirógenas e inmunosupresoras, las coagulasas o globulinas exocelulares, las fibrinolisininas o estafiloquinasas proteolíticas, las hidrolasas (hialuronidasas, fosfatasas, lipasas, penicilasas y nucleasas), y las enterotoxinas (B, C1, C2, C3, D, E, F, G y H) que son exotoxinas proteicas hidrosolubles, resistentes a proteasas, y muy termorresistentes. Éstas son las responsables de la toxiinfección y de los cuadros de enterocolitis, se absorben a nivel intestinal y son potentes inductores de la síntesis de citoquinas, actuando como neurotoxinas y desencadenando el cuadro emético y dolor abdominal por estimulación de los nervios simpático y vago, y del centro emético.

S. aureus es ubicuo en la naturaleza y puede estar presente en aire, polvo y suelo, siendo muy resistente a las condiciones medioambientales aunque es un mal competidor con otros microorganismos. Forma parte de la microbiota habitual de piel, mucosas, nasofaringe y amígdalas, de hombre y animales, de tal modo que entre un 30 y 60% de la población sana es portadora de este microorganismo. Es un contaminante habitual de la carne y leche. Los alimentos más frecuentemente implicados son aquéllos donde existe escasa microbiota competidora, como productos cocidos o cocinados y curados, o bien productos mal manipulados o mal refrigerados. La intoxicación alimentaria se debe a la presencia en el alimento de las enterotoxinas, independientemente de si en el momento del consumo del alimento el microorganismo es viable o no. Cantidades de 1 µg de toxina ingerida son ya capaces de

desencadenar el cuadro clínico. La sintomatología suele aparecer tras un periodo de incubación de entre 30 minutos y 8 horas tras la ingesta del alimento contaminado. Aparecen náuseas, vómitos, diarrea y dolor cólico abdominal, pero suele remitir en 24-72 horas.

2.2.4- *Escherichia coli*.

El género *Escherichia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). La especie *E. coli* incluye bacilos gram negativos, móviles, con flagelos peritricos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, que pueden presentar cápsula, muy resistentes a la temperatura y a los agentes externos. Pueden crecer a pH entre 4.4 y 10, y en medios con valores mínimos de actividad de agua de 0.95. Fermentan azúcares, produciendo ácidos y gas pero no sulfhídrico (Pascual Anderson, 1989). Son microorganismos ubicuos, muy resistentes a las condiciones medio ambientales, que forman parte de la microbiota intestinal de hombre y mamíferos, pudiendo así contaminar agua, suelo, alimentos y vegetales, y siendo por tanto un indicador de contaminación fecal. Sus principales reservorios son vacuno, ovino, porcino y aves, en los que puede actuar como comensal no patógeno. Presenta una gran variabilidad antigénica y muchos de sus serotipos son apatógenos, pero otros como *E. coli* O157:H7, O121, O104:H21, O26:H11, O103:H3 y O113:H21, son responsables de infecciones y cuadros entéricos y diarreicos. Entre sus factores de virulencia se encuentran los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K), y las fimbrias y adhesinas, además de otros factores, a continuación descritos, que determinan su patogenicidad y cuadro clínico:

- Plásmidos que incrementan su capacidad de invasión -> cepas de *E. coli* enteroinvasivas (ECEI). Son causantes, en humanos, de un cuadro invasivo intestinal similar al de *Shigella*, con una fagocitosis dirigida en las células de la mucosa del colon, diarrea mucosa-sanguinolenta, fiebre, náuseas y vómitos.
- Enterotoxina citotóxica similar a *Shigella* -> cepas de *E. coli* enteropatógenas (ECEP). Son causantes de cuadros diarreicos en niños y lactantes, principalmente en países poco desarrollados y tropicales (Cleary *et al.*, 1985).
- Enterotoxinas y cuadro clínico similares a *Vibrio cholerae* -> cepas de *E. coli* enterotoxigénicas (ECET). Son causantes de procesos diarreicos en humanos y otros mamíferos. Suelen cursar de forma autolimitante, como la “diarrea del viajero”, aunque en niños e individuos inmunocomprometidos pueden dar lugar a cuadros graves similares al cólera. Están implicadas dos toxinas, una enterotoxina termolábil (LT) y una toxina termoestable (ST).

- Enterotoxina citotóxica similar a *Shigella dysenteriae* -> cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (ECEH) o verocitotoxigénicas (ECVT), como el serotipo O157:H7. Estas cepas poseen un plásmido que codifica para las verotoxinas o toxinas tipo shiga (SLT -> shiga-like toxins) que actúan a nivel del colon. Afecta a hombre y animales, y desencadena un proceso diarreico grave, de tipo hemorrágico. Cursa con una colitis hemorrágica que puede desembocar en un síndrome urémico hemolítico o una púrpura trombocitopénica.
- Hemolisinas, enterotoxina termolábil (LT) y fimbrias -> cepas de *E. coli* enteroagregativas (EAEC). Afecta sólo a humanos, colonizando la mucosa intestinal y dando lugar a un cuadro de diarrea acuosa profusa, sin fiebre.

Existen distintas cepas y serotipos de *E. coli* causantes de infecciones en hombre y mamíferos, transmitidas principalmente por vía fecal-oral. *E. coli* O157:H7 es el principal representante de las cepas de *E. coli* ECEP y es un patógeno emergente causante de toxiinfecciones alimentarias. Su dosis infectiva es de tan solo 100 ó 200 microorganismos, mientras que para las otras cepas de *E. coli* se requieren más de 10^5 ufc/g de alimento. La mayor parte de los brotes se deben al consumo de leche cruda y carne de vacuno insuficientemente cocinada, pero también pueden verse implicadas leches incorrectamente pasteurizadas, aguas, vegetales, frutas y otras carnes insuficientemente cocinadas.

2.2.5- Campylobacter.

El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteraceae*, clase *Epsilonproteobacteria*, orden *Campylobacterales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity et al., 2007), siendo *C. jejuni* y *C. coli* las principales especies implicadas en procesos entéricos en humanos. Este género incluye bacilos pequeños, gram negativos, incurvados o vibrioides, microaerófilos, móviles con un desplazamiento en espiral muy característico y un flagelo polar en uno o en sus dos extremos, no esporulados, y que pueden presentar cápsula. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 25 y 42 °C, y son muy sensibles al pH, actividad de agua y desecación, oxígeno, temperatura y agentes químicos como el cloro y ácidos. Su actividad bioquímica es extremadamente lenta y su metabolismo es estrictamente respiratorio, de modo que no fermentan azúcares sino que utilizan como fuente de energía y de carbono aminoácidos y ácidos tricarboxílicos (Pascual Anderson, 1989).

Campylobacter es un microorganismo ubicuo, presente en medios acuáticos y suelos, y es además comensal del tracto gastrointestinal de animales salvajes y domésticos, siendo sus principales reservorios vacuno, ovino, porcino, roedores, aves, perros y gatos, así como humanos (por ejemplo puede estar implicado en el síndrome de Reiters en humanos). Puede contaminar fácilmente alimentos como carne

(especialmente pollo y otras aves), leche, frutas y vegetales, pescados y moluscos, y la superficie de huevos, y su dosis infectiva es baja, de unos 500 microorganismos ingeridos ó 2-3 ufc/g de alimento. En la Unión Europea la incidencia de brotes por *Campylobacter* ha seguido una tendencia creciente desde el año 2005, alcanzando en 2009 una incidencia superior a *Salmonella*, con 198.252 casos declarados frente a los 108.614 de *Salmonella* (EFSA, 2011). *C. jejuni* es el responsable del 90% de las infecciones humanas y *C. coli* del 10% restante. Al alcanzar el intestino, el microorganismo se multiplica y coloniza la mucosa de forma similar a *Shigella*, llegando a invadir la lámina propia de colon e intestino delgado y desencadenando una enterocolitis inespecífica que puede llegar a ulceración de la mucosa intestinal. El cuadro clínico cursa con fiebre, dolor abdominal y diarrea profusa que puede llegar a ser sanguinolenta por ulceración de la mucosa. El periodo de incubación es de 2 a 5 días, y el cuadro diarreico suele durar entre 2 y 3 días, pero pueden aparecer complicaciones como apendicitis, peritonitis, colecistitis y artritis, e incluso puede inducir un síndrome de Guillain-Barré o polineuropatía inflamatoria desmielinizante con parálisis flácida ascendente (Roberts, 1996).

2.2.6- *Yersinia enterocolitica*.

El género *Yersinia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007), siendo *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* los principales patógenos en humanos de este género, causantes de gastroenteritis, peste y adenitis mesentérica respectivamente. La especie *Y. enterocolitica* engloba bacilos cortos o cocobacilos, gram negativos, no esporulados, que pueden presentar cápsula, pleomórficos en cultivos en agar, aerobios y anaerobios facultativos, con pilis y fimbrias. Son psicrotrofos, resistentes a la congelación, con una temperatura óptima de crecimiento de 29 °C pero pueden crecer en un rango entre -1 y 40 °C, aunque son muy sensibles al calor. Presentan flagelos peritricos, siendo móviles a temperatura inferior a 30 °C pero inmóviles a temperatura superior a 37 °C. Fermentan azúcares, produciendo ácidos pero no gas. Toleran concentraciones de sal de más de un 5 %, así como sales biliares y agentes tensoactivos, y pueden crecer en un rango de pH entre 4 y 9.

Y. enterocolitica es un microorganismo ubicuo, presente en agua, suelo y flora intestinal de animales. Su principal reservorio es el cerdo, donde se acantona en lengua, tonsilas y ciego, aunque también puede estar presente en roedores, reptiles y peces. Puede contaminar cárnicos, principalmente derivados del cerdo, pero también de otros animales como aves, pescados y mariscos, así como lácteos, frutas y hortalizas. Entre sus factores de virulencia se encuentran los factores capsulares,

antifagocitarios y activadores del sistema de complemento, las adhesinas, invasinas y fimbrias, la enterotoxina termoestable, muy resistente a la temperatura, congelación y pH, el lipopolisacárido de la pared bacteriana, y la endotoxina, de efecto adrenérgico y cardiotóxico. Al ingerir alimentos o aguas contaminadas por el microorganismo se puede contraer la yersiniosis. La dosis infectiva es alta, de 10^9 ufc/g de alimento. Cuando el microorganismo alcanza el intestino delgado se une a los enterocitos e induce su propia fagocitosis, alcanzando las placas de Peyer donde puede multiplicarse extracelularmente y alcanzar la lámina propia. El cuadro clínico presenta un periodo de incubación entre 1 y 3 semanas, y suele ser asintomático en adultos, mientras que en niños e individuos inmunocomprometidos cursa con fiebre, dolor abdominal y diarrea que puede llegar a ser hemorrágica. En algunos casos pueden aparecer complicaciones como apendicitis, eritema, artritis y septicemia (Robins-Browne, 1997).

2.2.7- *Clostridium botulinum*.

El género *Clostridium* pertenece a la familia *Clostridiaceae*, clase *Clostridia*, orden *Clostridiales*, phylum *Firmicutes* (Garrity *et al.*, 2007). La especie *C. botulinum* incluye bacilos largos, gram positivos, anaerobios estrictos, no encapsulados, móviles, con flagelos peritricos, y formadores de esporas termorresistentes, ovales, subterminales y deformantes. Fermentan la glucosa y producen sulfhídrico. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 25 y 37 °C, pero pueden crecer en un rango de 3 a 48 °C. Su pH óptimo de crecimiento es 7, pero pueden crecer en un rango entre 4.6 y 8. Toleran hasta un 10 % de sal, y el valor de actividad de agua mínimo para su crecimiento es 0.93. Son malos competidores con otra microbiota y presentan necesidades nutricionales complejas, como aminoácidos específicos, factores de crecimiento como tiamina y ácido aminobenzoico, y sales inorgánicas. Son productores de potentes neurotoxinas de siete tipos (A, B, C, D, E, F, G) serológicamente distintos, en función de las cuales se diferencian distintos subtipos dentro de esta especie, aunque hay cepas capaces de producir más de un tipo de toxina. *C. botulinum* subtipos A, B, E y F producen el botulismo humano, los subtipos C y D el botulismo animal, y el subtipo G es poco conocido pero se ha aislado del suelo y podría estar también implicado en el botulismo humano. La neurotoxina es sintetizada por el microorganismo en estado vegetativo y se libera al medio al final de la fase exponencial de crecimiento o bien por lisis del microorganismo. Cuando es ingerida por vía oral se escinde en sus dos subunidades por la acción de las proteasas digestivas, absorbiéndose a nivel intestinal y pasando a la sangre. De este modo la subunidad pesada puede alcanzar y unirse a receptores específicos de terminaciones nerviosas de nervios motores periféricos, tras lo cual la subunidad ligera pasa al

interior celular uniéndose a receptores del interior de la membrana presináptica, inhibiendo la liberación de acetilcolina y de otros neurotransmisores.

C. botulinum es un microorganismo ubicuo, telúrico, y saprófito fecal de aves y mamíferos, siendo el suelo su principal reservorio excepto para el subtipo E, que es acuático. Sus esporas son muy resistentes a la temperatura y a las condiciones medioambientales, pudiendo permanecer viables varios años. De este modo, el microorganismo puede contaminar cualquier alimento de origen animal o vegetal, siendo las conservas (especialmente las caseras) los principales productos implicados en los brotes de botulismo humano. La acción patógena la ejerce la neurotoxina liberada por el microorganismo. Dosis de toxina entre 0.1 y 1 µg pueden ser mortales, y es la única toxiinfección alimentaria en la que con que exista una sola persona afectada ya se considera un brote. El periodo de incubación varía entre 2 y 36 horas, y al principio pueden aparecer síntomas gastrointestinales (como náuseas y vómitos) pero rápidamente se manifiesta la sintomatología nerviosa. Ésta cursa con parálisis flácida y bilateral de los músculos periféricos, rigidez de cuello, dificultad para hablar y deglutir, visión borrosa por midriasis, y puede llegar a producir la muerte por asfixia, por parálisis de los músculos respiratorios y del diafragma. Existe además otra toxiinfección alimentaria causada por *C. botulinum*, el botulismo infantil o del lactante, que afecta a niños de menos de un año y se produce por la ingesta no de la neurotoxina, sino de esporas presentes en el alimento. Las esporas alcanzan el intestino delgado y el colon, donde germinan y las células vegetativas se multiplican y producen la neurotoxina. Generalmente, suele verse implicada la miel contaminada con esporas, y el cuadro clínico cursa con diarrea y parálisis flácida, pudiendo llegar también a parálisis respiratoria y muerte por asfixia.

2.2.8- *Clostridium perfringens*.

Esta especie del género *Clostridium* incluye bacilos gram positivos, rectos y grandes, anaerobios estrictos, inmóviles, no flagelados, encapsulados, y productores de esporas de tipo subterminal, oval, no deformante y termorresistente. Son altamente sacarolíticos, reductores de nitratos, fermentadores de azúcares y productores de sulfhídrico. Su temperatura óptima de crecimiento es de 43 a 47 °C pero pueden crecer en un rango entre 15 y 50 °C, siendo sin embargo muy sensibles al choque térmico. Su pH óptimo de crecimiento es 7, pero pueden crecer en un rango entre 5.1 y 9.7. Toleran hasta un 5-6% de sal, y el valor mínimo de actividad de agua para su crecimiento es de 0.93. Al igual que *C. botulinum*, tiene necesidades nutritivas complejas, requiriendo aminoácidos específicos, factores de crecimiento y sales inorgánicas. Entre sus factores de virulencia se encuentran los antígenos capsulares, la enterotoxina termolábil (que actúa a nivel de intestino delgado, interaccionando con

receptores específicos de membrana de las células del extremo distal de las vellosidades intestinales, induciendo la alteración de bombas de calcio, sodio y potasio, y desencadenando un cuadro diarreico), y las toxinas hemolíticas o necróticas (toxina alfa o lecitinasa C o fosfolipasa C - necrótica y hemolítica, la toxina beta - necrótica, la toxina delta - hemolítica, la toxina epsilon - necrótica, la toxina zeta - hemolítica, la toxina iota - necrótica, y la toxina kappa - con actividad colagenasa y necrótica). En función de estas toxinas se distinguen cinco tipos de *C. perfringens*, que son el tipo A (produce toxinas alfa, y a veces zeta y kappa), el tipo B (produce toxinas alfa, beta y epsilon), el tipo C (produce toxinas alfa, beta y delta), el tipo D (produce toxinas alfa y epsilon) y el tipo E (produce toxinas alfa e iota). Los tipos A y C están implicados en toxiinfecciones alimentarias (siendo el A más abundante y el C más grave) y en procesos patológicos como la gangrena gaseosa y la enteritis necrotizante, respectivamente. El tipo B está implicado en procesos diarreicos en herbívoros, el tipo D en procesos enterotoxémicos de vacuno, y el tipo E en la enterotoxemia del ternero.

C. perfringens es un microorganismo ubicuo, ampliamente distribuido en la naturaleza (especialmente el tipo A), que puede estar presente en suelo, polvo, sedimentos acuáticos, insectos y tracto gastrointestinal de hombre y mamíferos, siendo el hombre su reservorio más importante. Puede contaminar todo tipo de alimentos crudos, así como productos cocinados o procesados debido a su capacidad para generar esporas termorresistentes. La toxiinfección se debe a la ingesta de alimentos contaminados con el microorganismo, ya sea en forma vegetativa o esporulada, siendo su dosis infectiva de 10^5 ufc/g de alimento. Cuando se ingieren las formas vegetativas, éstas pueden esporular al llegar al intestino delgado, produciendo entonces la enterotoxina, que se liberará al medio al romperse la célula contenedora del endosporo. En el caso de ingesta de esporas, éstas germinarán en intestino liberando así la enterotoxina. El periodo de incubación varía entre 8 y 24 horas, y el cuadro clínico cursa con náuseas, vómitos, dolor abdominal, gastroenteritis y diarrea acuosa espumosa, siendo generalmente un proceso autolimitante.

2.2.9- Bacillus cereus.

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, phylum *Firmicutes* (Garrity *et al.*, 2007). La especie *B. cereus* incluye bacilos grandes, gram positivos, aerobios y anaerobios facultativos, móviles, con flagelos peritricos, hemolíticos y formadores de endosporos termorresistentes de tipo oval, central o subcentral y no deformante. Son reductores de nitratos y fermentan azúcares, aunque no pentosas ni azúcares-alcoholes, y no producen gas. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 30 y 37 °C, pero pueden crecer en un rango de 5 a 55 °C. Requieren para su multiplicación una actividad de agua mínima de

0.93, toleran un rango de pH entre 4.5 y 9.3, y hasta un 9 % de sal (Priest, 2008). Entre sus factores de virulencia se encuentran los antígenos flagelares (H), las proteasas, las fosfolipasas, las hemolisinas o cereolisinas, y las enterotoxinas que son exotoxinas secretadas por el microorganismo durante la fase exponencial de crecimiento (Drobniowski, 1993). Éstas pueden ser de dos tipos, dando así lugar a dos formas clínicas de toxiinfección, la exotoxina emética (que es un péptido cíclico, termoestable y resistente a pH extremo, producido por *B. cereus* durante su multiplicación sobre el alimento) y la toxina diarreica (de naturaleza proteica, termolábil y susceptible a la degradación por proteasas digestivas, y secretada por el microorganismo durante su multiplicación en el intestino). Todos estos factores unidos a la ubicuidad del microorganismo hacen que pueda estar implicado en diversos procesos patológicos, como infecciones cutáneas, de heridas, oculares y respiratorias, meningitis, endocarditis y septicemia, además de la toxiinfección con sus dos formas de manifestación clínica que se verán a continuación.

B. cereus es un microorganismo ubicuo saprófito, presente en suelo, polvo, sedimentos y aguas. Su ubicuidad y su capacidad para formar esporas termorresistentes hacen que pueda contaminar todo tipo de alimentos y sobrevivir al cocinado o procesado. En el síndrome emético suelen estar implicados principalmente alimentos ricos en almidón, como arroz, patatas y pasta, y por estos se le denomina “intoxicación de los restaurantes chinos”, mientras que en el síndrome diarreico suelen estar implicados productos cárnicos, lácteos, vegetales y RTE, sobre todo mal procesados o mal refrigerados. En ambos casos la dosis infectiva es alta, entre 10^5 y 10^8 ufc/g de alimento. La forma o síndrome emético presenta una sintomatología similar a la causada por *S. aureus*, con un periodo de incubación entre 0.5 y 5 horas, pudiendo aparecer un cuadro diarreico pero predominando las náuseas y vómitos. La forma diarreica es similar a la causada por *C. perfringens*, con un periodo de incubación entre 8 y 16 horas, pudiendo aparecer náuseas pero predominando el cuadro entérico, con diarrea acuosa profusa, tenesmo rectal y dolor abdominal. En ambas formas el proceso suele ser autolimitante y resolverse en menos de dos días (Kramer & Gilbert, 1989).

2.2.10- Shigella.

El género *Shigella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacteriales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Incluye cuatro especies o serogrupos, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, que pueden causar disentería bacilar y toxiinfección, pero son *S. sonnei* y en menor grado *S. flexneri* las principales implicadas en la shigelosis. Son bacilos rectos, gram negativos, inmóviles, no flagelados, no esporulados, que pueden presentar

cápsula, aerobios y anaerobios facultativos, y muy poco sacarolíticos. Utilizan el acetato como fuente de carbono, fermentan azúcares, aunque no la lactosa, y no producen gas ni sulfhídrico. Su temperatura óptima de crecimiento son 37 °C pero pueden crecer en un rango entre 7 y 46 °C, y a un pH entre 5.5 y 7.0. Son muy sensibles a la temperatura y a la congelación, así como a los ácidos, sales biliares, desecación, agentes tenso-activos, nitritos e irradiación, de modo que su crecimiento y la colonización de superficies, agua y alimentos se ve favorecida por mala higiene e incorrecta manipulación. Entre sus factores de virulencia se encuentran el antígeno somático (O), el antígeno capsular (K), las mucinasas, las integrinas y adhesinas, las proteínas Ipa y plásmidos implicados en la invasión y fagocitosis dirigida, y la endotoxina Shiga o Shiga toxina (Niyogi, 2005). Esta toxina es de naturaleza glucolipoproteica y es sintetizada por el microorganismo durante la fase exponencial de crecimiento, liberándose al medio tras la lisis microbiana. Consta de dos subunidades: la subunidad A es lipopolisacarídica, y en el interior de la célula hospedadora se escinde en dos fracciones (A1 y A2), y la subunidad B es polipeptídica y pentamérica. Tiene efecto citotóxico, enterotóxico, neurotóxico, e inhibidor de la síntesis proteica y de la división celular.

Es un microorganismo saprófito ubicuo, presente en agua, suelo y sedimentos, aunque es mal competidor y poco resistente a los agentes medioambientales. Su transmisión es principalmente fecal-oral, su único reservorio es el hombre y otros primates. Los insectos pueden actuar como vectores, especialmente la mosca doméstica. Puede contaminar cualquier tipo de alimento crudo, como lácteos, frutas y verduras, así como alimentos preparados y después manipulados por personas infectadas, o aguas de bebida o recreativas (como piscinas y parques acuáticos). La dosis infectiva es de tan sólo 100 microorganismos ingeridos, y el periodo de incubación varía entre 1 y 7 días. El microorganismo ingresa por vía oral y alcanza ileon y colon, induciendo inflamación, ulceración y necrosis de la mucosa. Posteriormente es capaz de atravesar la mucosa intestinal alcanzando la lámina basal y las placas de Peyer por la acción de mucinasas, en el interior de macrófagos y de células polimorfonucleares, así como por colonización y destrucción de las células epiteliales. Finalmente, ingresa en las células epiteliales por macropinocitosis y se replica en el citosol induciendo la apoptosis celular (Jennison & Verma, 2004). El cuadro clínico cursa con una colitis inflamatoria, fiebre, anorexia, dolor abdominal y diarrea acuosa profusa que puede evolucionar a mucosa y sanguinolenta, y tenesmo rectal. Generalmente es un proceso autolimitante que se resuelve en 5-7 días, pero el individuo queda como reservorio pudiendo eliminar el microorganismo en heces durante largo tiempo, de semanas a meses. Pueden además darse complicaciones, principalmente en niños e inmunocomprometidos, apareciendo procesos como

megacolon tóxico y perforación intestinal, síndrome urémico hemolítico, septicemia y síndrome de Reiter's con artritis inflamatoria reactiva por acantonamiento del microorganismo en articulaciones (Niyogi, 2005).

2.2.11- *Vibrio cholerae*.

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Vibrionales*, phylum *Proteobacteria* (Garrity *et al.*, 2007). Este género incluye más de 35 especies, la mayor parte de las cuales son de origen acuático siendo patógenos de peces y de otros animales acuáticos. *V. cholerae* es la especie más importante ya que es el agente causal del cólera, junto con *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* que pueden ocasionar gastroenteritis en humanos por el consumo de pescados y mariscos contaminados (Borrego *et al.*, 1996). *Vibrio cholerae* incluye dos biotipos que son el biotipo clásico y el biotipo El Tor, siendo el primero más virulento y el segundo más resistente a las condiciones medioambientales. Esta especie engloba a bacilos pequeños, ligeramente curvados, gram negativos, móviles, con un flagelo polar, no esporulados, no encapsulados, aerobios o anaerobios facultativos, con un metabolismo fermentativo, capaces de degradar azúcares sin producir gas. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 30 y 37 °C, pero pueden crecer en un rango entre 16 y 42 °C. Soportan altas concentraciones de sal, y su pH óptimo oscila entre 7.4 y 9.6 pero pueden crecer en un rango de 6.8 a 10.2. Presentan una gran diversidad de factores de virulencia como las adhesinas, fimbrias, lecitinas y antígenos flagelares (H), los antígenos somáticos (O) pirógenos, las hemolisinas (en el biotipo El Tor), las neuraminidasas, y la toxina colérica, que es una exoenterotoxina de naturaleza glucolipopoliipeptídica, formada por dos subunidades.

V. cholerae es un microorganismo ubicuo, presente en agua y materia orgánica. Es causante del cólera, que se contrae principalmente por la ingesta de aguas o alimentos contaminados, como vegetales regados con aguas fecales o contaminadas. La bacteria ingerida por vía oral llega al intestino, donde se multiplica y libera la enterotoxina. El periodo de incubación varía entre 1 y 5 días, apareciendo bruscamente los síntomas que incluyen vómitos, dolor abdominal y diarrea aguda muy intensa. Los enfermos de cólera eliminan por vía fecal entre 10^6 y 10^8 ufc/g, pudiendo contaminar agua, suelos, utensilios y alimentos. Las moscas y otros insectos pueden actuar como vehículo de difusión. Existen portadores asintomáticos y cuadros leves pero importantes desde el punto de vista de la diseminación del microorganismo. Además *V. cholerae* puede dar lugar a infecciones extraintestinales, como abscesos, infecciones óticas y biliares, y septicemia.

3- TECNOLOGÍAS DE CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

El Código Alimentario Español define alimento conservado como aquél “que después de haber sido sometido a tratamientos apropiados, se mantiene en las debidas condiciones higiénico sanitarias para el consumo durante un tiempo variable” (RD 2484/1967). En general, para la conservación e higienización de los alimentos existen distintas tecnologías que pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Tecnologías convencionales
- Tecnologías alternativas o emergentes

3.1 - Tecnologías convencionales.

Incluyen a su vez muy diversos métodos o técnicas, como:

3.1.1- Tecnologías basadas en la separación de los microorganismos.

Son técnicas que consisten en separar a los microorganismos del alimento, como la decantación, filtración o centrifugación. Su aplicación en la industria alimentaria es muy limitada.

3.1.2- Tecnologías basadas en la inhibición de la actividad metabólica.

Incluyen técnicas que persiguen el descenso de la actividad de agua (como la deshidratación o adición de solutos), el descenso de la temperatura (como refrigeración y congelación), el descenso del potencial redox (como el envasado a vacío o en atmósferas modificadas o controladas), el descenso del pH (como la fermentación o la adición de acidificantes), y la inhibición química de la multiplicación microbiana (por la adición de agentes bacteriostáticos o conservantes químicos tradicionales). A continuación se describen un poco más en detalle estas técnicas:

3.1.2.1- Deshidratación.

Se basa en la inhibición del crecimiento microbiano mediante la eliminación del agua disponible en el alimento, gracias a técnicas como el secado, deshidratación, y liofilización, e incluye la salazón (en seco y en salmuera), la aplicación de aire caliente, el ahumado y la extrusión. Al eliminar el agua del alimento se ven concentrados los solutos, lo que inhibe a la mayor parte de las bacterias que requieren valores mínimos de actividad de agua entre 0.88 y 0.91. Sin embargo, las esporas microbianas sobreviven a esta tecnología.

3.1.2.2- Refrigeración.

Consiste en el mantenimiento del alimento a baja temperatura pero siempre por encima del punto de congelación, usando por tanto temperaturas entre -2 y 16 °C. Al

reducir la temperatura disminuye la velocidad de las reacciones químicas y el estado de fluidez de los lípidos de la membrana celular. Sin embargo a estas temperaturas pueden crecer microorganismos psicrófilos y psicrotrofos, por lo que si la población inicial de estos microorganismos es alta, el alimento se alterará rápidamente. Según el tipo de alimento permite alargar la vida útil de unos días hasta semanas.

3.1.2.3- Congelación.

Consiste en la bajada de la temperatura del alimento hasta al menos -18°C y requiere posteriormente de su mantenimiento o almacenamiento a esta temperatura o más baja. Con este proceso, al congelar el agua del alimento se ve reducida la actividad de agua, por lo que muy pocos microorganismos pueden crecer (generalmente mohos) y disminuye además la actividad de algunas enzimas y la velocidad de las reacciones químicas. Sin embargo, algunas formas vegetativas, así como las esporas microbianas, sobreviven a la congelación. Permite una conservación de los alimentos durante largos periodos de tiempo.

3.1.2.4- Envasado en atmósferas protectoras.

Incluye distintos tipos de envasado de los alimentos, entre los que se encuentran:

- El envasado a vacío. Implica sencillamente la eliminación del aire dentro del envase en el que se encuentra el alimento, sin que sea reemplazado por otro gas, y suele dejar una presión residual de unos 10 mm Hg. Se emplea en muy diversos productos, como carnes frescas o curadas, quesos, etc. Su principal limitación es que la aplicación de vacío puede provocar la deformación del producto. Además, al continuar las actividades respiratorias de los tejidos del producto (como por ejemplo en la carne y vegetales) durante el almacenamiento, se va a ir produciendo un aumento de la concentración de dióxido de carbono y de vapor de agua en el interior del envase, produciéndose un cambio de color (pardeamiento) y la acumulación de exudado.
- El envasado en “atmósfera controlada” (CAP). Implica que la composición del gas que rodea al alimento se mantiene constante a lo largo de un cierto tiempo mediante un control continuado y renovación continua de la mezcla de gases. Por el contrario, en el envasado en “atmósfera modificada” (MAP) la composición de gases que rodea al alimento se ajusta al principio del almacenamiento, generalmente en el momento de envasar el alimento, y no se vuelve a controlar o ajustar. Mediante CAP y MAP se controlan las reacciones químicas, enzimáticas y microbianas, minimizando la degradación o alteración durante el almacenamiento del producto. Para las atmósferas protectoras se

utilizan principalmente tres gases: oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono. El nitrógeno es un gas inerte, inodoro, incoloro, insípido, muy poco soluble en agua y grasas, y se utiliza para sustituir el aire en el interior del envase, actuando como gas de relleno (evitando el colapso del envase) y evitando problemas oxidativos y de crecimiento de microorganismos aerobios. El dióxido de carbono es un gas inodoro e incoloro, soluble en agua y grasas, y se usa por su capacidad fungiestática y bacteriostática. El oxígeno favorece el crecimiento de microorganismos aerobios y el enranciamiento de ciertos productos, pero en algunos casos es necesaria su presencia para mantener el color adecuado del producto, por ejemplo en carnes frescas. Otros gases que también están permitidos para el envasado en atmósfera protectora son el argón, helio, óxido nitroso e hidrógeno (RD 142/2002).

3.1.2.5- Conservantes químicos tradicionales.

Se considera como conservante a aquella sustancia química capaz de retardar o evitar el crecimiento de microorganismos, previniendo procesos de fermentación, acidificación o descomposición, que causan deterioro en las propiedades organolépticas y/o el valor nutritivo del alimento (Surekha & Reddy, 1999). Se incluyen aquí muy diversos compuestos como:

- Ácidos orgánicos y sus ésteres. Su principal efecto sobre los microorganismos se debe a su acción sobre la membrana, alterando su permeabilidad y transporte de metabolitos, sin embargo en general sólo tienen actividad a pH por debajo de 5.5 (Abee & Wouters, 1999). Incluyen compuestos como el ácido sórbico y sorbatos, ácido benzoico y benzoatos, ácido acético y acetatos, ácido láctico y lactatos, y ésteres de sacarosa de ácidos grasos de larga cadena.
- Nitritos. Se pueden usar en forma ácida o sus sales, en productos cárnicos curados. Son más efectivos a bajo pH. Su concentración está limitada a 150 ppm para la mayoría de productos (CE 2/95). Para actuar deben degradarse en sus correspondientes ácidos y óxidos, los cuales se unen a los grupos amino del sistema de las deshidrogenasas inhibiéndolas, e inhiben también a los citocromos y enzimas con grupos sulfhidrilo. Inhibe a alterantes y patógenos, incluido el *Clostridium botulinum*, y además confiere a los productos curados su color y sabor típico. Sin embargo existen problemas de toxicidad a corto y largo plazo. A corto plazo existe el problema de metaglobinemia, en la que se produce oxidación del ión ferroso de la hemoglobina y pasa a ión férrico, por lo que la hemoglobina se transforma en metahemoglobina, que pierde capacidad para fijar el oxígeno, y se ve impedida la correcta oxigenación de los tejidos del organismo. En condiciones normales, la metahemoglobina no supera el 1-2%

gracias a la metahemoglobín-reductasa. Sin embargo, en lactantes y ciertas patologías esta enzima no está activa y no puede reducir los niveles de metaHb. A largo plazo, existe el problema de las nitrosaminas. Éstas son aminas volátiles que se originan durante el tratamiento térmico y/o el almacenamiento de los productos. Se forman a partir del radical nitrilo procedente de los nitritos, al reaccionar con aminas secundarias. Son compuestos tóxicos, mutagénicos y cancerígenos.

- Polifosfatos. Son derivados de fosfatos, como el pirofosfato sódico o tetrasódico, tripolifosfato sódico, tetrapolifosfato sódico, hexametáfosfato sódico y fosfato trisódico.
- Cloruro sódico. Ejerce un efecto osmótico inhibitorio sobre los microorganismos excepto sobre halotolerantes. Eleva la presión osmótica del medio y disminuye la actividad de agua del alimento.

3.1.3- Tecnologías basadas en la inactivación microbiana y enzimática.

La técnica más usada es la aplicación de calor, pero su principal inconveniente es su inespecificidad, pues la temperatura no sólo afecta a los agentes de alteración (como microorganismos o enzimas) sino también a las propiedades sensoriales y valor nutritivo de los alimentos. Entre los distintos sistemas de tratamiento por calor se encuentran:

3.1.3.1- Escaldado.

Es un tratamiento térmico suave que somete al producto a una temperatura inferior a 100 °C durante un tiempo más o menos largo. Se aplica antes del procesado, principalmente para destruir la actividad enzimática de frutas y verduras. En la conservación de hortalizas permite fijar su color y disminuir su volumen antes de la congelación, inactivando enzimas que podrían degradarlas durante su conservación. Permite además reducir el número de microorganismos contaminantes, principalmente mohos, levaduras y formas vegetativas bacterianas de la superficie de los alimentos. No es en sí un tratamiento de conservación, pero contribuye al efecto conservador de operaciones posteriores.

3.1.3.2- Pasteurización

Es un tratamiento térmico relativamente suave (con temperaturas inferiores o iguales a 100 °C) que se utiliza para prolongar la vida útil de los alimentos, ya que destruye a la mayoría de las formas vegetativas pero no las esporas. Se considera pasteurización alta el tratamiento con alta temperatura (72 °C) durante un corto periodo de tiempo (15 seg), y pasteurización baja el tratamiento con baja temperatura

(63 °C) durante un periodo más largo de tiempo (30 min). La pasteurización inactiva enzimas y destruye microorganismos sensibles a la temperatura (mohos, levaduras y bacterias no esporuladas), provocando cambios mínimos en el valor nutritivo y características organolépticas de los alimentos. La intensidad de este tratamiento, así como sus efectos se ven determinados principalmente por el pH del producto. Así, en alimentos de baja acidez (pH > 4.5) el objetivo principal de la pasteurización es la destrucción de bacterias patógenas, mientras que en alimentos de alta acidez (pH < 4.5) persigue la destrucción de microorganismos alterantes y la inactivación de enzimas. El tiempo de conservación de estos productos es más corto que el de los esterilizados, y en muchos casos requiere de unas condiciones de mantenimiento determinadas, como refrigeración (Vidal *et al.*, 1999).

3.1.3.3- Esterilización.

Es un tratamiento térmico muy intenso, que somete al producto a temperaturas entre 127 y 150 °C durante largos tiempos (de hasta 20 min), y se realiza en autoclaves o esterilizadores. Debido a su intensidad puede afectar al valor nutritivo del alimento y a sus características organolépticas. El tratamiento UHT (ultra high temperature) utiliza altas temperaturas (135-150 °C) durante corto tiempo (1-3 seg), tratando así de minimizar su repercusión sobre el valor nutritivo y organoléptico del alimento. La esterilización emplea vapor de agua sobrecalentado, entre 120-150 °C. Permite alargar la vida útil de productos como leche, zumos, natas, concentrados... hasta varios meses, sin que para ello sea necesario el almacenamiento del producto en refrigeración, ya que destruye formas vegetativas y esporas (Vidal *et al.*, 1999).

3.1.3.4- Cocción y cocinado.

Permite la destrucción de bacterias termosensibles pero no así de las formas esporuladas. El cocinado incluye el horneado o asado, fritura en aceite y microondas.

3.2- Tecnologías alternativas o emergentes.

El desarrollo de tecnologías no térmicas, alternativas y/o complementarias a los tratamientos de conservación tradicionales, responde a la creciente demanda de alimentos mínimamente procesados. Estas tecnologías tratan mantener o mejorar la seguridad que se obtiene mediante la aplicación de los métodos convencionales de conservación de los alimentos, evitando o minimizando su principal inconveniente, que es la pérdida o reducción del valor nutritivo o de sus características organolépticas. Estas nuevas tecnologías son en general técnicas suaves, poco agresivas, que tratan de ofrecer productos muy semejantes a los frescos (Herrero & Romero de Avila, 2006; Aymerich *et al.*, 2008). Entre estas tecnologías se tratará con especial detalle la

aplicación de antimicrobianos naturales como la lactoferrina y sus derivados (apartado 5), y el tratamiento con altas presiones hidrostáticas (apartado 6).

3.2.1- Irradiación de alimentos.

Es un método físico de conservación que consiste en exponer el producto a la acción de radiaciones ionizantes durante un cierto periodo de tiempo, que será proporcional a la cantidad de energía necesaria que absorba el producto. Como fuentes de energía ionizante se pueden usar rayos gamma (provenientes de ^{60}Co ó ^{137}Cs), rayos X, y electrones acelerados.

Según su intensidad puede llegar a permitir la destrucción de microorganismos patógenos y alterantes, así como de insectos, parásitos y brotes, ya tiene acción directa sobre el ADN y ARN, y provoca desnaturalización de enzimas y alteración de membranas celulares. Tiene escaso efecto sobre las características nutricionales y organolépticas del producto, siendo comparable o menor a los cambios inducidos por los procesos de enlatado, cocción o congelado. Según la OMS la clasificación en función de la dosis de energía aplicada sobre el producto incluye:

- Dosis baja (inferiores a 1 kGy). Permite demorar los procesos fisiológicos como germinación, maduración y senescencia de frutas y vegetales, así como controlar insectos y parásitos de los alimentos.
- Dosis media (1-10 kGy). Reduce la carga de patógenos y alterantes, y mejora las propiedades tecnológicas de ciertos alimentos (reduce el tiempo de cocción de productos vegetales deshidratados). Se denomina radurización o radicación. A dosis inferiores a 3 kGy es un tratamiento equivalente a la pasteurización.
- Dosis alta (10-50 kGy). Se conoce con el nombre de radapertización y se usa para la esterilización de carnes, mariscos, pescados y preparaciones, en combinación con un suave tratamiento térmico que permite inactivar enzimas. Se usa también para esterilizar ciertos ingredientes como especias.

Sin embargo, no es un método adecuado para alimentos muy grasos o lácteos, ya que puede favorecer el enranciamiento y desarrollo de olores y sabores desagradables (por formación de peróxidos e hidroperóxidos a partir de los lípidos, que a su vez dan lugar a aldehídos y cetonas, y producción de sulfuro de hidrógeno a partir de proteínas ricas en azufre). En general es un método poco aceptado por el consumidor. En la Unión Europea su aplicación es mínima y sólo está aprobado para ciertas hierbas aromáticas, especias y condimentos (RD 348/2001), aunque en algunos países, como Francia, Bélgica y Holanda, su uso está más extendido.

3.2.2- Calentamiento óhmico.

Consiste en aplicar un calentamiento eléctrico directo haciendo pasar una corriente eléctrica a través del alimento. Es un proceso de aplicación de alta temperatura durante un corto tiempo. Permite pasteurizar o esterilizar, induciendo cambios mínimos en las propiedades del alimento (Hugas *et al.*, 2002)

3.2.3- Aplicación de pulsos de luz.

Consiste en la aplicación sucesiva de pulsos o destellos de luz de gran intensidad (con un espectro entre el ultravioleta y el infrarrojo próximo) y corta duración sobre la superficie del alimento. Permite inactivar o inhibir contaminantes de la superficie de alimentos sólidos o de superficies (envases), así como descontaminar líquidos que dejen pasar la luz. Es eficaz frente a formas microbianas vegetativas y frente a algunas esporas, y logra inactivar enzimas causantes del deterioro de los alimentos. En la Unión Europea se encuentra en fase de estudio para su posible aprobación. Uno de sus principales objetivos es mejorar la calidad y seguridad de los productos pesqueros de consumo con un mínimo o ningún procesamiento.

3.2.4- Aplicación de pulsos eléctricos. (PEF)

Consiste en someter al alimento a un campo eléctrico intenso (10-50 kV/cm) de forma sucesiva durante cortos periodos de tiempo (1-100 μ segundos), lo que permite destruir microorganismos patógenos y alterantes debido al daño causado en las membranas celulares, con aparición de poros (electroporación) y alteración de la permeabilidad celular. Sin embargo, su efecto sobre formas esporuladas es limitada. En general los mohos y levaduras son muy sensibles, seguidos de bacterias gram negativas y finalmente gram positivas. Se aplica principalmente a fluidos viscosos (como zumos y papillas de frutas y verduras), pero el producto requiere conservación en refrigeración, y el coste es elevado. También se ha estudiado su posible aplicación en leche como alternativa a la pasteurización (Qin *et al.*, 1995)

3.2.5- Microondas.

Su acción se basa en el calentamiento provocado por el movimiento y fricción de moléculas polares (como agua, proteínas y carbohidratos) e iones cargados del alimento, como consecuencia de su interacción con las microondas, permitiendo así inactivar microorganismos (Díaz-Cinco & Martinelli, 1991). Su principal inconveniente se debe a la falta de uniformidad en el tratamiento, pudiendo aparecer en el alimento “puntos fríos” en los que no se alcanzan las condiciones adecuadas para la inactivación de los microorganismos. Entre sus posibles aplicaciones se encuentra la pasteurización de leche (Hamid *et al.*, 1969).

3.2.6- Ultrasonidos.

Los ultrasonidos son ondas sonoras con una frecuencia superior a la perceptible por el oído humano (> 16 kHz). Los ultrasonidos de alta intensidad (20-100 kHz) al transmitirse a un medio líquido provocan un fenómeno de cavitación, que implica la formación, crecimiento e implosión de burbujas, liberándose una gran cantidad de energía y alcanzándose altas temperaturas (de hasta 5000°C) y presiones (de hasta 1000 atmósferas) en el seno del líquido (Suslick, 1990). Su efecto bactericida fue descrito ya en 1929 (Harvey & Loomis), siendo las bacterias gram negativas más sensibles que las gram positivas, y mostrando resistencia las formas esporuladas. Su principal limitación se encuentra en la dificultad de obtener a escala industrial las intensidades ultrasónicas que se logran en laboratorio.

3.2.7- Antimicrobianos naturales o bioconservantes.

Se basa en el efecto de la microbiota natural o añadida de los alimentos y/o sus productos antibacterianos (como bacteriocinas o antibióticos naturales) y/o de compuestos con actividad antimicrobiana naturalmente presentes en los alimentos. (Stiles, 1996; Tiwari *et al.*, 2009). La adición de antimicrobianos puede además realizarse mediante un tipo especial de envasado, el envasado activo. Es éste un tipo de envasado en el que el envase, el producto y el entorno que lo rodea interaccionan para alargar la vida útil de los alimentos, mejorar las propiedades organolépticas y/o seguridad alimentaria, manteniendo la calidad del producto (Vermeiren *et al.*, 1999). El proceso permite mejorar la funcionalidad del envase gracias a la adición de una sustancia activa al material de envasado (Appendini & Hotchkiss, 2002). Estos componentes activos incorporados al envase pueden ser capaces, por ejemplo, de absorber oxígeno, controlar la concentración de dióxido de carbono o etileno, desprender etanol, liberar antioxidantes, regular la humedad, o controlar el crecimiento de microorganismos. Las sustancias antimicrobianas añadidas al material de envasado migran al alimento de forma gradual durante su almacenamiento y distribución. Esta tecnología resulta efectiva para evitar o minimizar la contaminación superficial de los alimentos, de aquí el interés de su aplicación en productos cárnicos listos para el consumo, en los que debido a la manipulación post-procesado la contaminación ocurre principalmente en la superficie del producto. Algunos agentes antimicrobianos utilizados en el envasado son ácidos orgánicos, sulfitos, nitratos, alcoholes y antimicrobianos naturales, y se consideran como aditivos alimentarios. Dentro de estos bioconservantes o antimicrobianos naturales se incluyen tanto microorganismos como diversos tipos de compuestos:

3.2.7.1- Bacterias lácticas.

Están reconocidas como GRAS (“generally recognized as safe”) por la FDA y como QPS (“qualified presumption of safety”) por la EFSA. Su utilización en alimentos, así como la de sus metabolitos (que se verán a continuación), ha recibido gran atención en los últimos años. Son responsables de la fermentación y maduración de muchos alimentos (lácteos, cárnicos, vegetales). Permiten el control de otros microorganismos (alterantes y patógenos) mediante la competencia por nutrientes, así como por la producción de ácidos y la correspondiente bajada del pH (ácido láctico y acético) y por la producción de diversos antimicrobianos, fundamentalmente bacteriocinas (Työppönen *et al.*, 2003; De Vuyst & Leroy, 2007).

Las bacterias lácticas pueden emplearse en alimentos como cultivos iniciadores, como probióticos y como cultivos bioprotectores, principalmente frente a *L. monocytogenes* pero también frente a otros patógenos, incluyendo cepas enteropatógenas de *E. coli*, y frente a alterantes, incluyendo determinadas cepas de bacterias lácticas. En productos cárnicos se ha demostrado la eficacia de *Pediococcus acidilactici* (Foegeding *et al.*, 1992; Baccus-Taylor *et al.*, 1993) y *Lactobacillus sakei* (Työppönen *et al.*, 2003) como cultivos bioprotectores en salchichas, de *Lactobacillus plantarum* en salami (Campanini *et al.*, 1993), y de *Leuconostoc gelidum* en carne envasada a vacío (Leisner *et al.*, 1996). También se ha demostrado la eficacia de bacterias lácticas pertenecientes a diversas especies como cultivos bioprotectores, como por ejemplo cepas de *Lactobacillus rhamnosus* en productos vegetales, aceitunas, masa madre de panadería, zumos y productos lácteos como yogur, leches fermentadas y bebidas lácteas (Saxelin, 2000; De Vuyst & Leroy, 2007), de *Lactobacillus plantarum* en queso Munster (Ennahar *et al.*, 1996), de *Enterococcus faecalis* en queso Manchego (Nuñez *et al.*, 1997) y de *Lactococcus lactis* en queso Gouda (Buyong *et al.*, 1998).

3.2.7.2- Bacteriocinas.

Son metabolitos antimicrobianos de espectro limitado producidos por bacterias. Las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son pépticos catiónicos de síntesis ribosomal, bajo peso molecular, hidrófobos, anfipáticos, con efecto antimicrobiano frente a cepas de diferentes géneros de bacterias lácticas y, además, frente a *L. monocytogenes* y otras bacterias gram positivas como *B. cereus* y *S. aureus*. Estas bacteriocinas inducen la permeabilización de la membrana, probablemente por la formación de poros ión-selectivos, alterando el transporte de protones y la síntesis de ATP intracelular (Dridet *et al.*, 2006). Se clasifican en tres grandes grupos (Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001). La clase I o lantibióticos está formada por péptidos de bajo peso molecular con aminoácidos atípicos o

modificados, e incluye bacteriocinas como la nisina, lactocina, lacticina, carnocina, estreptococcina y salivaricina. La clase II está formada por péptidos pequeños, termoestables y carentes de aminoácidos atípicos, e incluye compuestos como la enterocina, pediocina, sakacina, acidocina, carnobacteriocina, bavaricina, plantaricina, leucocina, lactacina y divergicina. La clase III está formada por péptidos de alto peso molecular (> 30 kDa), e incluye la helveticina, caseicina y enterolisina.

Las bacteriocinas pueden emplearse en los alimentos inoculando cultivos iniciadores productores de las mismas, incorporadas en un envase activo, adicionadas en la masa del producto o pulverizadas en superficie. Se ha demostrado su eficacia antimicrobiana en productos lácteos, cárnicos y vegetales, tanto fermentados como no fermentados (Cleveland *et al.*, 2001; Työppönen *et al.*, 2003; De Vuyst & Leroy, 2007). Hasta el momento, la nisina (de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) es la única bacteriocina reconocida como GRAS por la FDA e incluida en la lista de aditivos alimentarios en España (RD 142/2002 Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

3.2.7.3- Otros péptidos catiónicos antimicrobianos. (CAMPs)

Son pequeñas moléculas de naturaleza peptídica con un tamaño entre 7 y 100 aminoácidos, de los cuales hasta un 50% pueden ser hidrofóbicos, con carga neta positiva entre +2 y +9, y con capacidad para adoptar estructuras anfipáticas en medios no polares (Hancock & Scott, 2000; Chan *et al.*, 2006; Haug *et al.*, 2007; Wiesner & Vilcinskis, 2010). Conforman un grupo muy heterogéneo de moléculas, y se considera que representan un mecanismo de defensa ancestral no del todo explorado, formando parte del sistema inmune innato de un amplio rango de organismos, incluido el hombre (Boman, 1995; Jenssen *et al.*, 2006), aunque fue en insectos de donde se aislaron por primera vez (Boman *et al.*, 1972; Steiner *et al.*, 1981). Su mecanismo de acción no está aún bien definido. Se considera que estos péptidos actúan por interacción electrostática con moléculas de la superficie microbiana cargadas negativamente, como fosfolípidos, lipopolisacáridos, ácidos teicoicos y lipoteicoicos, alterando la estructura y funcionalidad de la membrana (Matsuzaki *et al.*, 1995). Sin embargo, cada vez hay más evidencias de otras moléculas diana, incluso a nivel intracelular, llegando a alterar la síntesis de ADN y proteínas como mecanismos de acción (Haug *et al.*, 2007).

3.2.7.4- Lactato y diacetato.

El lactato está presente de forma natural en el tejido muscular animal. Es un agente bacteriostático que interfiere en el metabolismo microbiano, acidificando el medio, disminuyendo la actividad de agua, y alterando el transporte de protones a través de la membrana celular. Es eficaz frente a bacterias gram positivas y gram

negativas, y se ha descrito su capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos como *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Clostridium* (Marcos Muntal, 2007). Concentraciones de lactato entre un 2-4% son capaces de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos refrigerados (Weaber & Shelef, 1993; Blom *et al.*, 1997). Por otro lado, el diacetato sódico, un acidificante de origen natural, es también un potente agente antimicrobiano, siendo capaz de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos en concentraciones superiores al 0.2% (Schlyter *et al.*, 1993; Blom *et al.*, 1997). El lactato y el diacetato tienen además efecto sinérgico, lo que incrementa su efecto inhibitorio frente a *L. monocytogenes* (Mbandi & Shelef, 2002). Ambos están permitidos como aditivos para la fabricación de productos cárnicos en la Unión Europea (CE 2/95) y en Estados Unidos (FSIS/USDA, 2000).

4- CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS

La carne se considera como “aquellos tejidos animales que pueden emplearse como alimento” (Forrest *et al.*, 1975). El Código Alimentario Español la define como “la parte comestible de los músculos de los bóvidos, óvidos, suidos, cápridos, équidos y camélidos sanos, sacrificados en condiciones higiénicas. Por extensión se aplica también a la de animales de corral, caza de pelo y pluma y mamíferos marinos” (RD 2484/1967). En general, cuando se habla de carne, este término hace referencia al tejido muscular de los mamíferos que ha sufrido una serie de cambios químicos y físicos tras la muerte del animal, y con frecuencia incluye además tejido adiposo y hueso. La calidad de la carne se define como el conjunto de características logradas durante la producción, procesado y conservación, que permiten brindar al consumidor un producto diferenciado y que cumpla tres categorías (Wood, 1990): el valor nutritivo (composición química), la seguridad (higiene y ausencia de contaminantes) y la satisfacción al consumirla (características organolépticas).

4.1- Composición química.

Es muy variable, y depende de la especie y raza animal, pieza anatómica, así como de la alimentación y genética del animal. Por ejemplo, la composición promedio del tejido muscular bovino libre de grasa subcutánea (Forrest *et al.*, 1975) es: agua (65-80%), proteínas (16-22%), lípidos (1.5-13%), carbohidratos (0.5-1.5%) y cenizas (1%). Las proteínas musculares pueden clasificarse en función de su solubilidad en sarcoplásmicas (como la mioglobina, hemoglobina, enzimas asociadas a la glucólisis, al ciclo del ácido cítrico y a la cadena transportadora de electrones), miofibrilares (como la actina, miosina, troponina, tropomiosina, actinina alfa y beta, proteína C y proteína M) y proteínas del estroma (que son proteínas constituyentes del tejido conectivo y proteínas miofibrilares asociadas a éste). Se encuentran además

compuestos nitrogenados no proteicos como aminoácidos, péptidos sencillos, creatina, fosfato de creatina, nucleótidos y nucleósidos. Los lípidos de la carne (sin incluir el tejido adiposo subcutáneo) aparecen principalmente entre los haces musculares, dando así el veteado, marmoleo o “marbling”, existiendo además lípidos intracelulares. En general se considera que estos lípidos de la carne tienen un mayor grado de insaturación que los del tejido adiposo. El contenido en carbohidratos es bajo, y está constituido principalmente por el glucógeno, además de pequeñas cantidades de glucosa, mono y disacáridos e intermediarios del metabolismo glucolítico. La carne es una buena fuente de vitamina A y de vitaminas del complejo B, particularmente tiamina, niacina, riboflavina, piridoxina y cianocobalamina. Es rica en hierro, cobre, zinc y selenio, siendo sin embargo relativamente pobre en calcio (100 mg/100 gr) y contiene además cantidades importantes de sodio (60-90 mg/100 g) y potasio (300 mg/100 g).

A nivel del consumidor se considera que hay tres determinantes de la calidad de la carne además del sabor y aroma, que son el color, la jugosidad y la dureza o terneza (Pearson, 1966).

- El color de la carne es función de dos factores, los pigmentos de la carne y las propiedades de dispersión de la luz. El pigmento básico de la carne es la mioglobina, mientras que la hemoglobina también está presente aunque en muy pequeña cantidad. La mioglobina está constituida por una parte proteica, la globina, y un grupo hemo que incluye un anillo planar de protoporfirina IX con un átomo de hierro central. Este átomo de hierro tiene seis enlaces de coordinación, uno de ellos unido a la globina y cuatro a los átomos de nitrógeno, mientras que el restante enlace de coordinación puede unirse a diversas sustancias que presenten la configuración electrónica correcta. En la carne fresca la mioglobina generalmente existe en tres formas que confieren distinto color. La mioglobina reducida presenta el hierro reducido (Fe^{2+}) y agua en el sexto enlace de coordinación, siendo su color rojo púrpura y encontrándose en ausencia de oxígeno, como por ejemplo en el interior de la pieza cárnica o en carnes envasadas a vacío. La oximioglobina es la forma oxigenada de la mioglobina con el hierro en forma reducida (Fe^{2+}), ocupando el oxígeno el sexto enlace de coordinación. Tiene color rojo brillante y es el pigmento deseable en la carne fresca. La metamioglobina tiene el hierro en su forma oxidada (Fe^{3+}) y agua en el sexto enlace de coordinación, siendo de color marrón e incapaz de ligar oxígeno, y su contenido va aumentando según madura la carne. En la carne también pueden aparecer otros pigmentos derivados de la mioglobina, no deseables, como la sulfomioglobina. Ésta se forma por la combinación de la mioglobina con sulfhídrico de origen bacteriano,

y es de color verde. Puede aparecer puede aparecer por ejemplo en carne de ave procedente de animales no eviscerados debido a la producción de sulfhídrico en el intestino y su difusión a la carne, y en carnes envasadas a vacío. Por otro lado, la intensidad de la reflexión de la luz está relacionada con la estructura muscular y volumen miofibrilar. Así, la carne pálida, blanda y exudativa (PSE – “pale, soft, exudative”), tiene un bajo volumen miofibrilar y presenta una alta capacidad de reflexión de la luz, por lo que la luz penetra a poca profundidad en la carne pues es rápidamente reflejada y la absorción por la mioglobina es pequeña, por lo que la carne aparece pálida. La carne oscura, seca y firme (DFD), tiene una capacidad de reflexión muy limitada, permitiendo a la luz incidente penetrar a mayor profundidad y siendo absorbida en gran parte por la mioglobina, apareciendo así como una carne oscura.

- La jugosidad está relacionada con la capacidad de retención de agua de la carne y con el veteado o marmoleo del músculo, es decir por la grasa intramuscular (Forrest *et al.*, 1975). La capacidad de retención de agua es la capacidad de la carne para retener su propia agua de constitución y está determinada en gran parte por el contenido en proteínas, principalmente miofibrilares. El efecto del veteado se debe principalmente a que actúa como una barrera frente a la pérdida de humedad de la carne durante el cocinado, de forma que la pieza cárnica se contrae menos y es más jugosa (Smith *et al.*, 1982). La jugosidad está además muy relacionada con la dureza o terneza de la carne, y así a mayor terneza más rápidamente se liberarán los jugos al masticar. Está también influida por el proceso de cocinado a que se someta la carne (Cross, 1986), de tal modo que un cocinado intenso hace a la carne más dura y menos jugosa.
- La terneza se puede definir como la capacidad de la carne para dejarse cortar y masticar. Es consecuencia de factores intrínsecos como características del animal (edad, sexo, especie y raza), el tipo de músculo, fenómenos *postmortem* involucrados en la instauración y resolución del *rigor mortis*, y procesos de maduración de la carne como tenderización y proteolisis de proteínas miofibrilares (mediadas a su vez por la actividad de enzimas musculares como calpaínas y catepsinas). Por tanto está en gran parte definida por el sistema de producción y manejo *postmortem* de las canales y piezas, además de por distintos componentes de la carne como el tejido conectivo, las fibras musculares y lípidos asociados al tejido muscular. Así, por ejemplo, el tejido conectivo aumenta la dureza de la carne pues refuerza los puentes y uniones interfibrilares (Lawrie, 1966). Hay que tener en cuenta que durante el calentamiento de la carne o cocinado se producen dos cambios fundamentales:

las fibras musculares se hacen más duras y el tejido conectivo se hace más blando (Lawrie, 1966). Esto es consecuencia de la coagulación de las proteínas miofibrilares y de la solubilización del tejido conectivo y formación de gelatina. Existen además diversos métodos para “ablandar” las carnes, como el empleo de ácidos débiles (vinagre o jugo de limón) y tratamientos mecánicos como picado, cortado o machacado (Forrest *et al.*, 1975).

- El sabor y aroma dependen de la presencia en la carne de precursores de los compuestos responsables del “flavour” que se desarrolla por el cocinado. Estos precursores son lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas y otros compuestos orgánicos que, por efecto de la temperatura, van a reaccionar dando una mezcla de componentes volátiles característicos del aroma y sabor (Horstein & Wasserman, 1986). Todo esto a su vez depende de la especie, raza, edad, sexo y alimentación del animal, y de la conservación de la carne. Los lípidos al oxidarse van a dar lugar a lactonas, cetonas, alcoholes y ácidos grasos de cadena corta, mientras que las proteínas y aminoácidos van a dar lugar a compuestos azufrados volátiles, y los carbohidratos sufrirán la reacción de Maillard y darán lugar a compuestos de pardeamiento no enzimático. Además, otros compuestos como el ácido láctico afectarán al pH de la carne, el cual a su vez influirá sobre las reacciones del resto de compuestos antes citados. En general se considera que aproximadamente el 70% de los compuestos volátiles de la carne son carbonilos como aldehídos y cetonas, furanos, pirazinas y compuestos azufrados (Dwivedi, 1975).

4.2- El sector cárnico.

El sector cárnico constituye un sector de primera magnitud dentro del conjunto de la industria alimentaria como lo demuestra el hecho de que de los 10,604 millones de euros que alcanzó el gasto alimentario en España en 2008, un 35.4% correspondieron a la carne y derivados, muy por encima de sectores como el de la pesca (13%) o el lácteo (11%). En la Unión Europea el valor de la producción cárnica superó ampliamente los 45,000 millones de euros en 2008, representando el 22% de la producción agraria. Dentro de las especies que integran el sector cárnico la mayor producción se refiere a la carne de porcino (supone el 60% de todas las carnes obtenidas), seguido de aves (20-25%) y vacuno (11-13%), y finalmente ovino (4-8%), caprino (0.2%) y otras especies como conejos y equino. Para el año 2020 está previsto que la demanda mundial de carne supere los 300 millones de toneladas y se espera un incremento espectacular de la carne de ave (Bilgili, 2002). En la Tabla 1, a continuación, se muestra la tendencia de la producción de carne en España para las principales especies de consumo (AICE, 2010):

Tabla 1. Producción de carne en España de las principales especies cárnicas consumidas, entre los años 1990 y 2010.

Producción de carne (en miles de Tm)							
Año	Porcino	Vacuno	Ovino	Caprino	Equino	Aves	Conejos
1990	1789	514	217	16	7	837	nd
1991	1886	507	212	15	5	882	nd
1992	1916	538	216	16	6	868	nd
1993	2089	488	224	16	7	832	nd
1994	2108	483	225	16	8	877	nd
1995	2175	508	227	15	7	920	nd
1996	2316	565	223	14	7	878	nd
1997	2401	592	229	16	8	902	nd
1998	2744	651	233	16	7	998	nd
1999	2892	678	221	17	6	1002	nd
2000	2912	632	232	19	7	987	nd
2001	2993	642	236	15	8	1307	nd
2002	3123	654	240	15	6	1331	nd
2003	3190	703	236	14	5	1330	nd
2004	3176	703	231	13	5	1300	nd
2005	3164	714	232	12	5	1327	74
2006	3184	673	215	11	5	1281	73
2007	3456	643	236	11	5	1328	75
2008	3484	658	237	13	6	1375	69
2009	3290	598	121	9	6	1316	61
2010	3390	589	125	9	6	1341	63

(nd -> no determinado)

En España, durante el año 2008 el consumo total de carne ascendió a 2,878 millones de kilos. El mayor porcentaje de consumo se centró en los hogares (79%), mientras que en restauración comercial supuso el 17%, y en restauración colectiva y social el 4%. En los hogares la carne fresca tiene una presencia notable (76%), mientras que la carne congelada y la transformada representan porcentajes menores, de un 22 y 2 % respectivamente. En la restauración comercial, la carne fresca supone un 55%, la carne congelada un 20% y la transformada un 25%. En la restauración colectiva y social, la carne fresca representa un 58%, mientras que la transformada alcanza el 27%.

En los últimos años se han detectado ciertas tendencias en el consumo de carne, observándose que el consumo de carne en los hogares aumenta según factores como la clase social, la ausencia de niños en el hogar, si la persona responsable de hacer las compras no trabaja, si la persona responsable de hacer las compras tiene más de 50 años, el menor número de miembros en el hogar, pequeños municipios frente a grandes ciudades, y hogares con jubilados, adultos independientes, parejas adultas sin hijos o con hijos mayores.

Dentro de los elaborados y productos cárnicos se ha detectado una tendencia al alza en su consumo en España, de tal modo que su producción supera el millón de toneladas y registra unos incrementos interanuales de en torno al 2%. La mayor

producción y consumo corresponde a jamones y paletas curados, seguidos de embutidos curados, jamones y paletas cocidos y otros productos cocidos. Además se ha detectado un incremento en el consumo de nuevos productos y/o presentaciones de productos, como los loncheados, con tasas de crecimiento interanual del 10%. Esta tendencia creciente del consumo de diversos productos y derivados cárnicos se recoge en la Tabla 2 (AICE, 2010).

Tabla 2. Producción en España para los principales productos cárnicos consumidos, entre los años 1997 y 2009.

Productos cárnicos (en miles de Tm)							
Año	Jamón y paleta curados	Embutidos curados	Jamón y paleta cocidos	Fiambres cocidos	Adobados y frescos	Platos preparados	Total
1997	182	157	126	242	127	44	878
1998	185	157	124	244	133	45	888
1999	194	157	127	255	140	46	919
2000	201	170	137	279	145	58	990
2001	204	179	151	299	168	60	1061
2002	234	184	158	329	170	64	1139
2003	246	192	170	346	171	67	1192
2004	249	193	173	351	175	69	1210
2005	251	193	174	355	170	71	1214
2006	265	193	179	360	182	74	1253
2007	270	196	183	368	184	77	1278
2008	272	197	184	382	186	84	1305
2009	245	185	175	385	180	81	1251

Desde un punto de vista culinario las carnes de consumo se clasifican en carnes rojas y blancas, lo que hace referencia a su aspecto o color en fresco. La carne roja suele provenir de animales mamíferos adultos tales como vacuno, porcino, equino, ovino y caprino mayor. Incluye también el avestruz y algunas carnes de caza. La carne blanca se refiere a la carne de aves en general (excepto el avestruz, y a veces se consideran también rojas la carne de pato y ganso) y algunos mamíferos jóvenes, como ternera, ovino y caprino lechal, el cochinillo o lechón y el conejo.

4.3- Derivados o productos cárnicos.

Los derivados cárnicos se definen como “productos alimentarios preparados total o parcialmente con carnes, despojos, grasas y subproductos comestibles, procedentes de animales de abasto u otras especies, y en su caso, de ingredientes de origen vegetal o animal, así como condimentos, especias y aditivos, siempre que estén autorizados y se ajusten a las normas específicas de calidad” (RD 2484/1967, RD 379/1984). Incluyen:

4.3.1- Carne picada.

Se define como “el producto constituido por la carne magra de vacuno, ovino o porcino, debidamente picada, que no ha sufrido la acción del calor, ni la maduración ni la maceración” (RD 1916/1997).

4.3.2- Embutidos frescos y productos cárnicos picados y reformados, crudos.

Son productos elaborados a partir de carne picada condimentada, y según el caso embutida en tripa natural o moldeada. No están curados ni ahumados y deben someterse a un tratamiento culinario antes de su consumo. Incluyen productos como hamburguesas, salchichas frescas y “filetes” reformados obtenidos a partir de carnes recuperadas mecánicamente.

4.3.3- Productos cárnicos cocidos o escaldados.

Son productos cárnicos que han sido sometidos a un tratamiento térmico de pasteurización, esto es a temperaturas mínimas de 62 °C en el centro térmico del producto, y frecuentemente entre 70 y 80 °C (ICMSF, 2001). Incluye productos muy variados en cuanto a formulación y elaboración, como el jamón cocido, fiambres, mortadelas, roulada, chicharrones, galantina, patés, morcillas, salchichas tipo Frankfurt, y muy diversos productos como puddings y pasteles.

4.3.4- Embutidos y productos curados o fermentados.

Bajo esta denominación se incluyen productos cárnicos, troceados o no, adicionados de sal y otras sustancias de curado, que se someten a un proceso de maduración-secado y/o fermentación apropiado y, opcionalmente, ahumado (Martín Juárez, 2005). Entre los ingredientes de curado se encuentra la sal y los nitratos/nitritos, y coadyuvantes como polifosfatos, ascorbatos y sacarosa. Engloba productos como chorizo, salchichón, sobrasada, lomo embuchado, morcón, jamón curado y beicon.

4.3.5- Productos de casquería.

Comprenden diversas piezas que proceden de la evisceración de vacuno, porcino, ovino y aves. Se incluyen productos como la asadura de cordero (hígado, pulmón y corazón), callos (estómago de terneros, cordero y cerdo), cabezas de ternera, carrilladas de ternera, corazón (ternera, cordero y cerdo), criadillas (testículos de ternero, cordero, cerdo), morros de ternera y cerdo, gallinejas de cordero, lenguas (ternera, cordero y cerdo), manitas (ternera, cordero, cerdo), mollejas (timo de ternera, cordero, cerdo), riñones (ternera, cordero, cerdo), sangre de cordero y cerdo, sesos

(ternera, cordero y cerdo), zarajos (intestino de cordero), hígado y corazón de aves, alitas de aves.

4.3.6- Comidas preparadas.

Bajo esta denominación se incluyen las carnes precocidas o pre-cocinadas, que pueden además ir acompañadas de otros ingredientes no cárnicos, como arroz, pasta, salsas y vegetales. El producto se formula así para que constituya una comida completa o su principal componente. Se suelen denominar productos con “cocción-refrigeración” aunque también pueden distribuirse en congelación, y requieren de la mezcla de sus diversos ingredientes y de su calentamiento antes de ser consumidos. Un tipo especial de estos productos “cocción-refrigeración” son los productos “sous-vide”. En este procesado los productos que lo componen se cuecen, se envasan a vacío y después se someten a pasteurización ya envasados, o bien existe un procedimiento alternativo en el que los productos se envasan crudos a vacío y se cuecen ya envasados. Estos productos se comercializan refrigerados y después deben ser calentados para su consumo.

4.4- Alteraciones microbianas de la carne y los productos cárnicos.

Se considera como microbiota alterante a aquellos microorganismos que al crecer sobre los alimentos degradan sus componentes de forma que cambian sus propiedades organolépticas, modificando sabor, olor, textura o color, haciéndolos inaceptables para su consumo. Los microorganismos alterantes de cada alimento son, en general, los que constituyen su propia y característica microbiota. Ésta puede variar en cada fase del proceso de producción y/o almacenamiento siendo, finalmente, el resultado de la interacción de los microorganismos existentes en el alimento crudo y de los procesos de producción, conservación y almacenamiento del mismo. Hay que tener en cuenta que la carne representa un excelente medio para el crecimiento de los microorganismos, ya que es rica en nutrientes (como compuestos solubles como carbohidratos, ácido láctico y aminoácidos) y sus valores de actividad de agua (0.99) y pH (5.5-6.0) se encuentran dentro de los límites de crecimiento de muchos microorganismos como bacterias, mohos y levaduras. Aunque en esencia la carne se considera libre de microorganismos (Gill, 1979), ésta se puede contaminar fácilmente a partir de la piel, pelo o plumas, y tracto gastrointestinal durante el desollado, eviscerado y troceado de las canales, así como a partir de superficies y utensilios durante su procesado y manipulación. El bajo potencial de óxido-reducción existente en el interior de la carne hace posible el desarrollo de microorganismos anaerobios facultativos y obligados, mientras que en su superficie se dan condiciones adecuadas para el crecimiento de aerobios. La alteración de la carne va a depender del tipo y

cantidad de microbiota contaminante inicial y de las condiciones de manejo y almacenamiento (Borch *et al.*, 1996).

4.4.1- Microbiota alterante de carne fresca.

El almacenamiento de la carne al aire (sin vacío) y bajo refrigeración es el proceso tecnológico más generalizado para la conservación y comercialización de la carne. En carne conservada de este modo se considera que comienza a detectarse alteración del olor cuando los niveles de aerobios totales alcanzan valores de $10^7/\text{cm}^2$, y la limosidad es visible cuando alcanzan valores de $10^8/\text{cm}^2$. Estos olores anómalos o desagradables se deben a la producción de una mezcla de compuestos como ésteres, compuestos azufrados, cetonas, alcoholes de cadena ramificada, hidrocarburos insaturados y 3-metil-butanal. La microbiota alterante que predomina está constituida por bacterias bacilares, gram negativas, psicrotrofas, aerobias. Destacan géneros como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Psychrobacter*, siendo *P. fluorescens* la especie más importante y representando más del 50 % de la microbiota aislada de carne refrigerada (Cousin, 1982), seguida de *P. fragi*. En general, *Pseudomonas* predomina a partir de los 4 días de almacenamiento en refrigeración, y al cabo de 7 días constituye el 95% de la población microbiana alterante (Gill & Newton, 1977). Pueden también aparecer otros microorganismos como *Brochothrix thermosphacta*, sobre todo en carne de cerdo y cordero o en carnes muy grasas y de alto pH, así como *Micrococcus* y *Staphylococcus*, pero se considera que tienen una importancia muy limitada en el almacenamiento de la carne en refrigeración. Son también comunes, aunque a bajos niveles pues no pueden competir con el género *Pseudomonas*, otras especies bacterianas como *S. liquefaciens*, *E. agglomerans* y *H. alvei*. Pueden también aparecer levaduras, como *Cryptococcus* y *Candida*, pero su importancia es bastante limitada.

Como ya se ha indicado, las condiciones y temperatura de almacenamiento desempeñan un papel primordial en la alteración de la carne, pero es también determinante la influencia de la carga microbiana y tipo de microbiota iniciales. Así, en general se considera que por cada 10 °C que aumenta la temperatura, se duplica la tasa de crecimiento bacteriano esperado (Gill, 1986). Sin embargo, a temperaturas de refrigeración inferiores a 8 °C el efecto es más acusado, de tal forma que el tiempo que puede almacenarse una carne refrigerada se reduce a la mitad por cada 2-3 °C que se eleva la temperatura. En el rango habitual de temperaturas de refrigeración de la carne, que suele oscilar entre -1.5 y 5 °C, puede haber una variación en la tasa de crecimiento bacteriano de hasta ocho veces (James & James, 2002). Obviamente son las temperaturas de refrigeración más bajas las que más alargan la vida útil de la carne, pero hay que tener en cuenta que el crecimiento microbiano no se frena hasta

alcanzar los $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. En general, en carne fresca una concentración de bacterias totales del orden de 10^3 ufc/cm^2 se considera índice de una buena obtención y manipulación (Gill, 1982). Ayres (1960) demostró que en carnes con una carga inicial de 65 ufc/cm^2 la vida útil es de unos 21 días a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que una carga inicial de $6 \times 10^4\text{ ufc/cm}^2$ implica una reducción de la vida útil por debajo de 11 días.

4.4.2- Microbiota alterante de carne a vacío, en refrigeración.

El envasado a vacío ha significado un avance importante en la conservación de la carne y sus productos durante un tiempo prolongado. Sin embargo, para evitar alteraciones es necesaria su conservación a temperatura de refrigeración. Hay que tener en cuenta que a pesar del envasado a vacío, es frecuente la presencia de un pequeño porcentaje de oxígeno residual de entorno a un 1%, lo que permite el crecimiento de *Pseudomonas*. No obstante, el envasado a vacío favorece selectivamente a las bacterias lácticas, aunque también puede haber un crecimiento importante de *Brochothrix thermosphacta*, *Shewanella putrefaciens* y diversas enterobacteriáceas. Incluso se está empezando a reconocer a las especies psicrófilas de *Clostridium* (como *C. perfringens*) como un importante problema potencial en estas carnes. Las bacterias lácticas predominantes son los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium* y *Leuconostoc*, siendo mucho menos común *Lactococcus*. Por esto, la principal alteración de la carne fresca envasada a vacío y refrigerada es la acidificación, y normalmente no es detectable hasta que los recuentos alcanzan $10^8/\text{cm}^2$. Aparecen también diversos compuestos como el ácido D- y L-láctico, ácido isobutanoico, ácido isopentanoico, así como metanotiol y dimetilsulfuro, responsables de olores y sabores anómalos.

4.4.3- Microbiota alterante de productos cárnicos.

En carne picada hay que tener en cuenta que a diferencia de la carne en piezas, en la que la contaminación microbiana se limita prácticamente a la superficie, el proceso de picado hace que la carga microbiana se distribuya homogéneamente por toda la masa, produciéndose además la liberación del extracto acuoso de la carne lo que favorece el crecimiento microbiano. La alteración de la carne picada es similar a la de la carne en piezas anteriormente descrita, pero afecta a toda la masa cárnica y se ve acelerada. Hay además algunos estudios que demuestran que en carne picada el desarrollo de *P. fluorescens* potencia la multiplicación de *L. monocytogenes*, lo que podría deberse a la liberación de péptidos fácilmente metabolizables por *Listeria* como consecuencia de la intensa actividad proteolítica de *Pseudomonas* (Marshall *et al.*, 1992).

En productos cárnicos cocidos o escaldados las alteraciones son algo distintas a las de la carne fresca debido al tratamiento térmico y su procesado, por los que la carga microbiana queda reducida a valores comprendidos entre 10^1 y 10^4 ufc/g (Heiszler *et al.*, 1972) apareciendo en bajas concentraciones microorganismos como *Pseudomonas*, bacterias lácticas, levaduras y enterobacterias. Su alteración durante la refrigeración es similar a la de la carne fresca refrigerada pero más lenta, y pueden aparecer exudados, limo o viscosidad superficial, producción de gas, oxidación o enverdecimiento, aparición de olores y sabores anómalos, y procesos como acidificación, agriado y putrefacción.

En embutidos y productos curados o fermentados hay que tener en cuenta su particular elaboración, que implica la mezcla de la carne con aditivos, especias y/o sales de curado así como el proceso de curado-secado o fermentación. Todo esto hace que el pH de estos productos disminuya a valores de 4.8-5.0 y que se vea reducida la actividad de agua, lo que dificulta el crecimiento de patógenos y alterantes y asegura una gran estabilidad microbiológica del producto. En su microbiota se encuentran bacterias lácticas, principalmente *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus* y *L. plantarum*, que a su vez intervienen o contribuyen a las especiales características de estos productos curados o fermentados, por lo que en muchos casos se emplean como cultivos iniciadores. Este tipo de flora láctica se desarrolla rápidamente durante los primeros estadios del curado o fermentación, evolucionando desde niveles iniciales de 10^3 ufc/g hasta valores de 10^8 - 10^9 ufc/g al final del proceso. Sin embargo, los lactobacilos heterofermentativos y los leuconostocs son indeseables, pudiendo producir alteraciones como formación de gas, peróxidos y limo (Martín Juárez, 2005).

En el caso de las comidas preparadas, las formas de alteración a menudo están relacionadas con los constituyentes no cárnicos, como por ejemplo los vegetales. La microbiota alterante suele estar constituida por bacterias gram negativas como *Pseudomonas*, bacterias lácticas como *Lactobacillus*, y levaduras.

5- LA LACTOFERRINA

5.1- Generalidades.

La lactoferrina (LF) es una glicoproteína perteneciente a la familia de las transferrinas. Anteriormente se denominó lactotransferrina o lactosiderofilina (Montreuil *et al.*, 1960). Fue aislada e identificada por primera vez de leche bovina (Sørensen & Sørensen, 1939) y posteriormente de leche humana (Johannson, 1960).

La familia de las transferrinas engloba proteínas transportadoras de hierro que aparecen en vertebrados e invertebrados, e incluye proteínas como la transferrina sérica, siderofilina o serotransferrina, la ovotransferrina o conalbúmina, y la melanotransferrina (Crichton, 1990; Lambert *et al.*, 2005; Wally & Buchanan, 2007).

Todas las transferrinas comparten una alta homología en su secuencia aminoacídica, y así la lactoferrina humana (hLF) comparte un 51 % de identidad en su secuencia aminoacídica con la transferrina sérica humana, un 69 % con la lactoferrina bovina (bLF) y un 74 % con la canina (Crichton, 1990; Berlov *et al.*, 2007).

Como miembro de la familia de las transferrinas, la lactoferrina es capaz de ligar y transportar hierro en el organismo. Cada molécula de lactoferrina es capaz de ligar dos cationes hierro (II) ó (III) en coordinación con dos iones bicarbonato (HCO_3^-), lo que constituye una característica esencial de esta proteína y contribuye a sus diversas propiedades funcionales (Reiter *et al.*, 1975; Griffiths & Humphreys, 1977; Anderson *et al.*, 1989; Pakdaman *et al.*, 1998). Además, su afinidad por el catión hierro es unas 300 veces mayor que la de la transferrina sérica (Aisen & Leibman, 1972), presentando una constante de afinidad por el hierro (K_a) entre 10^{20} y 10^{24} M^{-1} (Baker & Baker, 2005). Al igual que otras transferrinas, la lactoferrina es capaz de ligar otros cationes como cobre y manganeso (Davidson & Lönnnerdal, 1989), zinc (Blakeborough *et al.*, 1983), galio (Vallabhajosula *et al.*, 1983) y vanadio (Edal & Sabbioni, 1989), aunque con menor afinidad. Presenta además una gran capacidad de interacción con otras proteínas de naturaleza más acídica, como caseínas, albúmina, inmunoglobulinas y lisozima (Hekman, 1971; Smith *et al.*, 1971; Butler, 1973; Watanabe *et al.*, 1984; Lampreave *et al.*, 1990; Van Berkel *et al.*, 1997).

En estado fisiológico, la lactoferrina aparece en el organismo parcialmente saturada de hierro (15-20%) y se denomina hololactoferrina (holoLF), presentando un color salmón que aumenta de intensidad con el grado de saturación. Su forma totalmente desaturada se denomina apolactoferrina (apoLF), es incolora y menos resistente a la temperatura, pudiendo sufrir desnaturalización y polimerización a temperaturas superiores a 60 °C mientras que la holoforma soporta temperaturas de hasta 80 °C (Brisson *et al.*, 2007). Se considera que su función fisiológica principal es el transporte de hierro en el organismo, y además forma parte del sistema inmune innato o inespecífico. Este aspecto ha sido ampliamente revisado distintos artículos como en los trabajos de Ziere *et al.* (1992), Levay & Viljoen (1995), Vorland (1999), Naidu (2000), Steijns & Van Hooijdonk (2000), Van Hooijdonk *et al.* (2000), Chierici (2001), Orsi (2004) Rodríguez-Franco *et al.* (2005), Valenti & Antonini (2005), Ward *et al.* (2005), Weinberg (2007), Legrand *et al.* (2008), Jenssen & Hancock (2009), Ochoa & Cleary (2009), y Tomita *et al.* (2009).

5.2- Estructura.

La lactoferrina es una glicoproteína de peso molecular entre 75 y 80 kDa, según la especie. Está formada por una sola cadena polipeptídica y presenta una alta homología entre especies en su secuencia primaria y en su cDNA. No obstante, su composición aminoacídica y número varían ligeramente según la especie. Así por

ejemplo, la hLF consta de 692 aminoácidos, la LF porcina de 685, la de ratón 688, la de rata 658, y la bLF así como la LF de búfalo, cabra, caballo y camello constan de 689 residuos aminoacídicos (Lambert *et al.*, 2005). Los aminoácidos más abundantes son el ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, cisteína, metionina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, triptófano, lisina, histidina y arginina (Metz-Boutigue *et al.*, 1984; Rey *et al.*, 1990). Esta cadena polipeptídica se pliega en β -láminas y α -hélices dando lugar a la formación de dos lóbulos globulares simétricos (lóbulos N y C), que están unidos por una región bisagra con tres vueltas de α -hélice y 10-12 aminoácidos, y que incluyen los residuos 1 a 333 y 345 a 689 en el caso de la bLF, y los residuos 1 a 333 y 345 a 692 en el caso de la hLF. La región bisagra o interlobular es altamente catiónica y se piensa que podría estar implicada en la actividad antimicrobiana de la LF (Bai *et al.*, 2010). Cada lóbulo (N y C) se divide a su vez en dos sublóbulos o dominios (N1, N2 y C1, C2), y toda la estructura globular de la molécula está estabilizada mediante puentes disulfuro entre residuos de cisteínas (Steijns & Van Hooijdonk, 2000). Es precisamente en la zona de unión de los dos dominios de cada lóbulo donde se produce la unión al catión hierro. Esta zona de unión está constituida por cuatro residuos aminoacídicos: un aminoácido neutro (histidina) y tres aniónicos (un ácido aspártico y dos tirosinas). El ión bicarbonato, que se une en coordinación con cada catión hierro, interacciona con un residuo de arginina. Esta estructura se representa en la Figura 2 (a continuación) adaptada de Karthikeyan *et al.* (1999). Los dos lóbulos de la molécula, N y C, comparten un 40% de identidad aminoacídica, por lo que se cree que proceden de la duplicación de un gen ancestral (Baker *et al.*, 2002). En la forma libre de hierro (apoLF) ambos lóbulos presentan una conformación abierta, mientras que en la holoLF ambos lóbulos presentan una conformación cerrada (Steijns & Van Hooijdonk, 2000; Kanyshkova *et al.*, 2001; Lönnerdal, 2003; Pan *et al.*, 2007c). El lóbulo N presenta mayor cantidad de residuos catiónicos que el C, que incluyen los residuos en posición 2 a 5 y 28 a 31 en la hLF y los residuos 17 a 42 en la bLF, y se cree que podrían estar implicados en la actividad antimicrobiana de la molécula (Nibbering *et al.*, 2001). Cuando la LF capta el primer átomo de hierro, en el lóbulo C, se produce un cambio en la conformación tridimensional de la molécula que activa al lóbulo N, el cual es entonces capaz de captar un segundo átomo de hierro. A diferencia del resto de transferrinas, la LF no libera el hierro ligado en condiciones neutras o ligeramente ácidas sino sólo a pH inferior a 3.5 o tras la interacción con receptores específicos (Abdallah & Chahine, 2000).

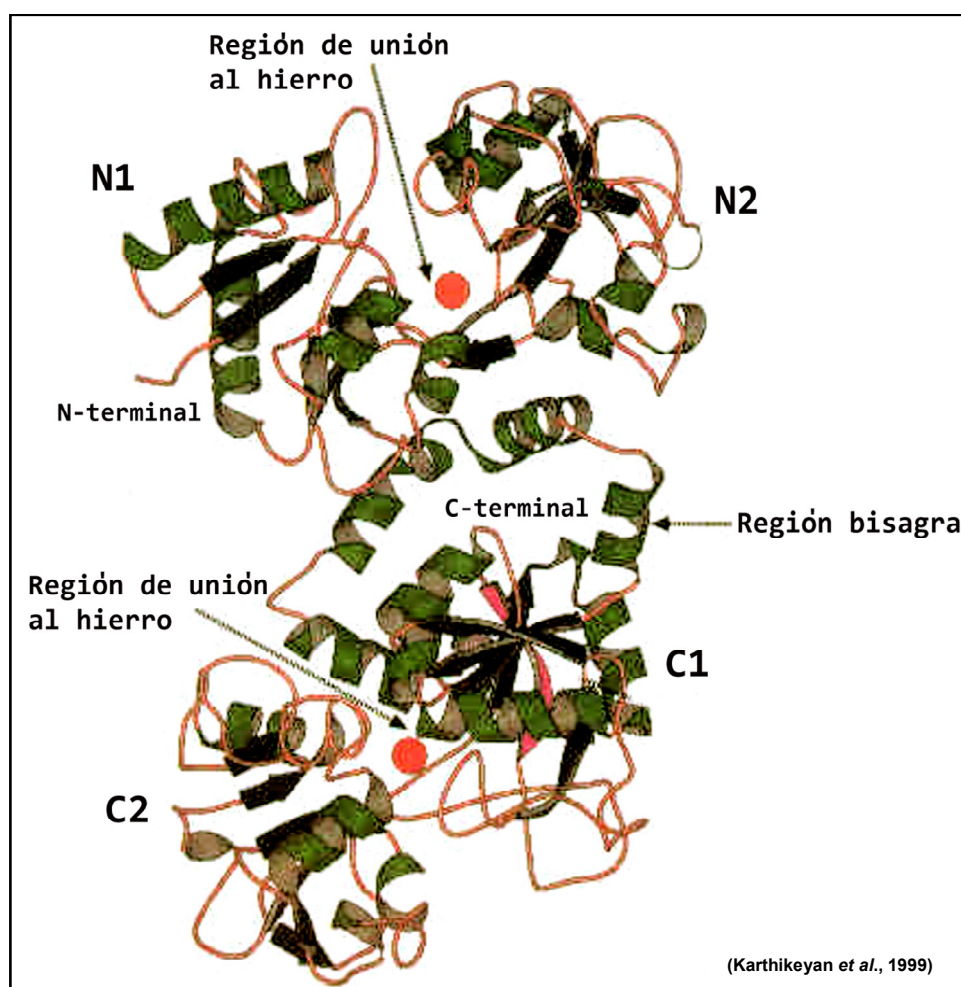


Figura 2. Estructura de la molécula de lactoferrina.

La molécula de lactoferrina presenta además cinco sitios potenciales de N-glicosilación que se corresponden con cinco residuos de aspártico. El número de glicosilaciones y el tipo de azúcares que forman parte de la cadena glucídica dependen de la especie (Pan *et al.*, 2007c). Así la bLF presenta cuatro glicosilaciones (en posición 233, 368, 476 y 545), mientras que la hLF presenta sólo dos (en posición 137 y 478). Los azúcares que aparecen más frecuentemente son la fucosa, manosa, lactosa, N-acetil-lactosamina y N-acetil-glucosamina. Se cree que estas cadenas glucídicas podrían actuar protegiendo a la molécula de LF del ataque de proteasas y ayudando a reducir la inmunogenicidad de la proteína (Spik *et al.*, 1988; Van Berkel *et al.*, 1995; Van Veen *et al.*, 2004).

La LF es una molécula fuertemente catiónica, con un punto isoeléctrico en torno a 8 ó 9 según se determine por electroforesis ó por cromatofoco, pero mediante técnicas de isoelectroenfoque se han obtenido resultados que varían entre 5.5 y 10. Como ya se indicó anteriormente, cada molécula de LF es capaz de quelar dos cationes hierro o distintos cationes mono, di y trivalentes. Mediante análisis estructurales por difracción con rayos X se ha observado que la conformación

tridimensional de la molécula varía adoptando distintas formas según su estado de saturación; es decir, según aparezca en su forma de apoLF, holoLF o saturada con otros cationes como el cobre (Baker *et al.*, 2002).

5.3- Biosíntesis y metabolismo.

La lactoferrina es sintetizada y secretada por las células epiteliales de mucosas y diversas localizaciones (Mason & Taylor, 1978), y está presente en todos los mamíferos. Es en calostro y en leche donde aparece en mayor concentración, aunque sus niveles varían según la fase del ciclo de lactación. Aparece además en el interior de los gránulos secundarios de neutrófilos y linfocitos, liberándose así al plasma sanguíneo. Como se muestra en la Tabla 3, la LF también está presente en muy diversas localizaciones como en secreciones exocrinas y recubriendo mucosas, y aparece en lágrimas, saliva, líquido sinovial, secreciones bronquiales, mucina, bilis, jugo pancreático e intestinal, plasma seminal, mucus cervical, orina, sudor y cerumen.

Curiosamente, su concentración en leche bovina es inferior (unas 10 veces menor) que en humana. Esto quizás podría explicarse por el efecto antimicrobiano que podría tener la LF, de modo que al aparecer en menor concentración en vacuno permitiría el buen desarrollo y establecimiento de la flora ruminal del ternero (Weinberg, 2007). Llama también la atención la escasa concentración en que aparece la lactoferrina en leche de gata y especialmente en rata, conejo y perro (Masson & Heremans, 1971); aunque en el caso de la leche de rata y conejo la transferrina aparece en alta concentración (superior a 2 mg/ml).

El gen que codifica para la síntesis de la LF aparece en todos los mamíferos y está altamente conservado entre especies, presentando idéntica organización (17 exones). Se cree que ha evolucionado por selección positiva o direccional (Liang & Jiang, 2010). Los polimorfismos en este gen están ampliamente distribuidos y se piensa que podrían ser responsables de la modulación de la actividad de la LF. En la especie humana el gen que codifica para la LF se encuentra localizado en el cromosoma 3, en ratón en el 9, y en bovino en el 22. La expresión de este gen, y la síntesis y secreción de la LF son específicas para cada tipo de tejido y están reguladas por hormonas como la prolactina, estrógenos esteroides, ácido retinoico y el factor de crecimiento epidérmico (Teng, 2002; Teng, 2010). La expresión del gen de la LF se detecta ya durante el inicio del desarrollo embrionario, en el embrión en estadio de 2-4 células, y continúa hasta el estadio de blastocisto durante la preimplantación. Después su expresión se detiene y no se retoma hasta la última mitad de la gestación, detectándose entonces en neutrófilos y células epiteliales del tracto digestivo y respiratorio del embrión.

Tabla 3. Localización y concentración de la lactoferrina en el organismo de mamíferos, en condiciones fisiológicas.

Localización	Concentración	Referencias
Calostro humano	4-16 mg/ml	Hirai <i>et al.</i> 1990, Steijns & Van Hooijdonk 2000, Korhonen & Marnila 2002, Marshall 2004,
Calostro bovino	0.5-1.5 mg/ml	Korhonen & Marnila 2002, Marshall 2004
Leche humana ^{*1}	1-6 mg/ml	Hirai <i>et al.</i> 1990, Steijns & Van Hooijdonk 2000, Korhonen & Marnila 2002, Marshall 2004,
Leche de cerda ^{*1}	0.6-1.3 mg/ml	Roberts & Boursnell 1975, Elliot <i>et al.</i> 1984
Leche de yegua, cobaya y ratón ^{*1}	0.2-2 mg/ml	Masson & Heremans 1971
Leche de camella ^{*1}	0.02-2.1 mg/ml	Al-Majali <i>et al.</i> 2007, Konuspayeva <i>et al.</i> 2007
Leche de oveja, cabra y vaca ^{*1}	0.1-0.4 mg/ml	Steijns & Van Hooijdonk 2000, Korhonen & Marnila 2002, Marshall 2004,
Leche de gata ^{*1}	< 0.1 mg/ml	Masson & Heremans 1971
Leche de rata, conejo y perro	<< 50 µg/ml	Masson & Heremans 1971, Berlov <i>et al.</i> 2007
Lágrimas	1-3 mg/ml	Kijlstra <i>et al.</i> 1983, Steijns & Van Hooijdonk 2000, Korhonen & Marnila 2002
Plasma seminal	0.2-1.9 mg/ml	Korhonen & Marnila 2002, Steijns & Van Hooijdonk 2000
Mucus cervical ^{*2}	0.5-1 mg/ml	Masson <i>et al.</i> 1966
Secreción bronquial	0.5 mg/ml	Brogan <i>et al.</i> 1975
Secreción nasal	0.1 mg/ml	Masson <i>et al.</i> 1966
Líquido sinovial	10-80 µg/ml	Steijns & Van Hooijdonk 2000, Korhonen & Marnila 2002
Bilis	10-40 µg/ml	Masson <i>et al.</i> 1966
Túbulos colectores renales	Nc	Abrink <i>et al.</i> 2000
Jugo pancreático	Nc	Masson <i>et al.</i> 1966, Colomb <i>et al.</i> 1974
Secreción intestinal	Nc	Masson <i>et al.</i> 1966
Neutrófilos y linfocitos	15 µg/10 ⁶ células	Bennet & Kokocinski 1978
Saliva ^{*3}	5-30 µg/ml	Steijns & Van Hooijdonk 2000, Korhonen & Marnila 2002, Tanida <i>et al.</i> 2003
Orina	1 µg/ml	Masson <i>et al.</i> 1966
Plasma sanguíneo ^{*4}	0.2-1.5 µg/ml	Bezwoda & Mansoor 1989
Cerumen	0-5 µg/g	Schwaab <i>et al.</i> 2011
Sudor	21 ng/ml	Park <i>et al.</i> 2011
Cerebro y fluido cerebro-espinal	Nc	Huang <i>et al.</i> 2007, Marriif <i>et al.</i> 2009

^{*1} – Su concentración varía según la fase de lactación, pudiendo disminuir a niveles hasta 10 veces inferiores en la mitad de la fase de lactación.

^{*2} – Su concentración varía según la fase del ciclo estral.

^{*3} – Su concentración aumenta en procesos infecciosos e inflamatorios, por ejemplo puede alcanzar niveles de hasta 14 mg/ml en infecciones de la glándula parótida.

^{*4} – Su concentración aumenta en procesos infecciosos e inflamatorios, pudiendo alcanzar los 0.2 mg/ml en sepsis sistémica. Procede de la lactoferrina liberada de los gránulos secundarios de neutrófilos y linfocitos.

Nc – no cuantificado.

La LF sintetizada en el organismo, una vez que ha cumplido su vida media, es transportada en sangre por los macrófagos hasta el hígado, donde es degradada, y finalmente es eliminada por vía renal, aunque también puede ser captada directamente en hígado por endocitosis de los hepatocitos, células de Kupfer y células endoteliales. Tras su degradación hepática, el hierro liberado de la molécula es transferido a la ferritina (Van Snick *et al.*, 1977). Cuando es administrada por vía intravenosa, la LF es rápidamente transportada al hígado y degradada, y así por ejemplo en ratas el 93% de la dosis inoculada por vía intravenosa es eliminada de la circulación en 5 minutos (Ziere *et al.*, 1992). Cuando es ingerida por vía oral, parte es degradada enzimáticamente en el tracto gastrointestinal dando lugar a péptidos de

pequeño tamaño como la lactoferricina, pero otra parte llega intacta al intestino (Kuwata *et al.*, 1998, 2001). No se conocen aún bien los mecanismos de actuación ni de absorción o distribución tras su ingesta, pero hay estudios que indican que la LF podría interaccionar a nivel intestinal con la intelectina (Suzuki *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2008). Además podría actuar a nivel del sistema inmune intestinal, estimulando la producción de interleucinas (IL-8, IL-10) y de γ -interferón en los nódulos linfáticos mesentéricos y en los linfocitos circulantes intestinales, e incrementando la actividad de las células natural killer (NK) y de los linfocitos T CD4⁺ y CDB⁺. Por otro lado, podría también actuar a nivel del sistema inmune sistémico aumentando el número de células en nódulos linfáticos y bazo, la producción de citoquinas y la actividad de los macrófagos (Kuhara *et al.*, 2000; Wakabayashi *et al.*, 2003a; Takakura *et al.*, 2006). Hasta la fecha, en el organismo se han identificado ciertos receptores específicos para la LF (LFRs) en diversas localizaciones, células y tejidos (Suzuki & Lönnnerdal, 2002), como por ejemplo en monocitos y macrófagos (Van Snick & Masson, 1976), linfocitos B y T (Van Snick & Masson, 1976; Birgens *et al.*, 1984), plaquetas (Leveugle *et al.*, 1993), hepatocitos (Bennatt & McAbee, 1997), células epiteliales mamarias (Rochard *et al.*, 1992) y células intestinales (Cox *et al.*, 1979; Mazurier, 1985; Hu *et al.*, 1988; Davidson & Lönnnerdal, 1988). Se considera que la LF, a diferencia de otros miembros de la familia de las transferrinas cuyo papel biológico más relevante es el transporte de hierro, forma parte importante de la defensa innata preinmune (efecto humoral inespecífico) y además, como se describe a continuación, podría desempeñar un importante papel en múltiples procesos o actividades y respuestas fisiológicas (Sánchez *et al.*, 1992; Conneely, 2001; Brock, 2002; Weinberg, 2003; Ward *et al.*, 2005; Wakabayashi *et al.*, 2006; Adlerova *et al.*, 2008; González-Chávez *et al.*, 2009).

5.4- Actividades.

La lactoferrina se considera en la actualidad como una proteína multifuncional. Entre las distintas actividades y funciones que se le atribuyen se encuentran: actividad bacteriostática, actividad bactericida, actividad prebiótica/probiótica, inhibición de la adhesión y colonización bacteriana, actividad antivírica, actividad antifúngica, actividad antiparasitaria, actividad antioxidante, actividad moduladora de la respuesta inmune e inflamatoria, actividad antitumoral, actividad osteoblástica, actividad enzimática y proteolítica, absorción intestinal de hierro, actividad moduladora de la coagulación, activación transcripcional y otras actividades. A continuación se describen brevemente estas actividades o funciones de la lactoferrina, algunas de las cuales no están completamente caracterizadas o comprobadas.

5.4.1- Actividad bacteriostática

La actividad inhibidora de la lactoferrina sobre el crecimiento bacteriano fue descrita por Reiter & Oram (1967) y Oram & Reiter (1968), quienes observaron el efecto bacteriostático de la LF sobre *Bacillus* sp. en leche. Este efecto bacteriostático se atribuye a la capacidad quelante de hierro de la LF, que causaría en los microorganismos una privación nutricional, inhibiendo así su crecimiento y la expresión de factores de virulencia (Bullen *et al.*, 1972). Posteriormente, este efecto bacteriostático se ha descrito para otros microorganismos como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Y. pseudotuberculosis* (Nonnecke & Smith, 1984; Rainar, 1986a,b; Salamah & Al-Obaidi, 1995a; Kutila *et al.*, 2003).

La LF está presente en las secreciones mucosas en su forma libre (apoLF), y por tanto tiene una gran capacidad para ligar hierro. Esta limitación de hierro inhibiría el crecimiento microbiano, de tal modo que la presencia de LF en mucosas constituiría la primera línea de defensa frente a los microorganismos. Sin embargo, esta privación de hierro causante del efecto bacteriostático es reversible, de tal modo que puede ser inhibido por la saturación de la LF con hierro y restaurarse el crecimiento microbiano al recuperarse la disponibilidad de hierro (Oram & Reiter, 1968). Además muchas bacterias patógenas son capaces de superar la privación de hierro, obteniéndolo a través de dos vías:

- Síntesis y secreción de pequeñas moléculas quelantes de hierro (sideróforos), como catecolatos, hidroxamatos o hidroxicarboxilatos. Estos sideróforos presentan una alta afinidad por el hierro y son capaces de captarlo del medio y transportarlo al interior celular (Braun & Killmann, 1999). Así por ejemplo se ha observado que la enteroquelina o enterobactina y aerobactina de *E. coli* (Rogers & Synge, 1978; Brock *et al.*, 1983), la vulnibactina de *V. vulnificus* (Okujo *et al.*, 1996) y los hidroxamatos de *Bordetella bronchiseptica* (Foster & Dyer, 1993) o la bordetelina de *B. pertussis* (Agiato & Dyer, 1992), son capaces de captar y aprovechar el hierro de la LF y de la transferrina sérica.
- Expresión de receptores proteicos de superficie bacteriana específicos para la LF. Este fenómeno se ha observado en especies bacterianas del género *Neisseria* (Blanton *et al.*, 1990), *Moraxella* (Campagnari *et al.*, 1994; Yu & Schryvers, 2000), *Aeromonas* (Ascencio *et al.*, 1992) y *Gardnerella* (Jarosik & Land, 2000), que son así capaces de interaccionar con la LF e internalizar el hierro unido a ésta (como se describe al final de la sección 6.5).

5.4.2- Actividad bactericida

El efecto bactericida de la lactoferrina fue descubierto con posterioridad a su efecto bacteriostático, y se describió por primera vez para distintas especies de

Streptococcus por Arnold *et al.* en 1977. Dicha actividad se considera que es más compleja que la simple bacteriostasis, no estando relacionada con la privación de hierro sino, probablemente, requiriendo de la interacción del extremo N-terminal de la LF (que es altamente catiónico) con la superficie bacteriana (Dalmastri *et al.*, 1988; Bellamy *et al.*, 1992a). Sin embargo el mecanismo de actuación por el que la LF ejerce su efecto bactericida no se conoce exactamente, existiendo diversas teorías o hipótesis (Valenti & Antonini, 2005; Ling & Schrivers, 2006) que tratan de explicarlo:

- Mecanismo de actuación similar al del quelante de cationes EDTA (ácido etilendiamino tetraacético). La LF además de quelar hierro es capaz de quelar otros cationes, de modo que podría quelar calcio y magnesio, que se encuentran estabilizando la pared y membrana bacterianas, por lo que se producirían repulsiones electrostáticas que inducirían la desestabilización y desestructuración de pared y membranas (Ellison *et al.*, 1988; Ellison *et al.*, 1990; Ellison, 1994; Rossi *et al.*, 2002).
- Mecanismo de actuación similar al de la polimixina B. La polimixina B es un lipodecapéptido cíclico policatiónico que es capaz de interaccionar iónicamente con los grupos fosfato del lipopolisacárido de la membrana externa de bacterias gram negativas; después su cadena de ácido graso se inserta en la bicapa fosfolipídica y altera su ordenación y estructura (Schroder *et al.*, 1992; Majerle *et al.*, 2003). De manera similar, la LF sería capaz de interaccionar electrostáticamente con moléculas cargadas negativamente de la pared microbiana, como el LPS (probablemente por los residuos carboxilo del 3-desoxi-D-mano-octulosonato y los residuos fosfato del lípido A) en bacterias gram negativas (Ellison *et al.*, 1988; Appelmelk *et al.*, 1994; Ellison, 1994; Ellass-Rochard *et al.*, 1995) y los ácidos teicoicos y lipoteicoicos (probablemente por los grupos fosfato) de gram positivas (Ellison *et al.*, 1988; Leitch & Willcox, 1999; Vorland *et al.*, 1999a). Como consecuencia de esta interacción estas moléculas serían retiradas de la pared microbiana, viéndose alterada la estabilidad, estructura y permeabilidad de pared y membrana microbianas (Ellison *et al.*, 1988; Ellison, 1994). Este fenómeno se ha observado en bacterias como *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *K. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *P. aeruginosa* (Appelmelk *et al.*, 1994).
- Además la LF podría interaccionar específicamente con porinas (proteínas integrales) de la membrana de bacterias gram negativas (Gado *et al.*, 1991; Naidu *et al.*, 1993; Erdei *et al.*, 1994), induciendo la liberación de moléculas de LPS y alterando la estabilidad y permeabilidad de membrana. Este fenómeno se ha observado para las porinas OmpF, OmpC y PhoE en *E. coli* (Sallmann *et*

al., 1999), y para otras enterobacterias como *Salmonella* y *Shigella* (Kishore *et al.*, 1991; Naidu & Arnold, 1994).

- Otros estudios parecen indicar la existencia de receptores intracelulares para la LF, de tal modo que ésta podría penetrar al citoplasma bacteriano e interactuar con moléculas como el ATP y ácidos nucleicos, alterando así la actividad metabólica y causando finalmente la muerte del microorganismo (Nibbering *et al.*, 2001).
- Finalmente, existe una hipótesis según la cual el mecanismo bactericida de la LF se basa en la inhibición de la bomba de protones H^+ -ATPasa, y por tanto en la alteración del pH intracelular y del gradiente de protones transmembrana (Andrés & Fierro, 2010), provocando una despolarización de membrana (Viejo-Díaz *et al.*, 2003). No obstante, aún quedan por determinar los dominios del complejo H^+ -ATPasa implicados en la interacción con la LF.

El efecto bactericida de la LF se ha comprobado en una gran variedad de microorganismos (como se recoge en las Tablas 4 y 5, para estudios *in vitro* y ensayos clínicos respectivamente), tanto gram positivos como gram negativos, cocos y bacilos, aerobios y anaerobios (Arnold *et al.*, 1980; Yamauchi *et al.*, 2006). En bacterias gram negativas se ha demostrado su eficacia frente a *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* y *S. dysenteriae* (Arnold *et al.*, 1980), *E. coli* (Stuart *et al.*, 1984; Shin *et al.*, 1998), *A. hydrophila*, *C. jejuni*, *H. pylori*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* y *Vibrio* sp. (Arnold *et al.* 1977, 1980; Paulsson *et al.*, 1993; Tomita *et al.*, 1994; Salamah & al-Obaidi, 1995a,b). En gram positivas se ha demostrado su eficacia frente a *Clostridium* spp. (Teraguchi *et al.*, 1995a), *L. monocytogenes* (Payne *et al.* 1990), *M. luteus* (De Lillo *et al.* 1997), *S. aureus* (Arnold *et al.*, 1980) y *Streptococcus* spp. (Arnold *et al.*, 1977, 1981, 1982). Sin embargo se ha demostrado también que ciertas bacterias, como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Prevotella nigrescens*, son capaces de degradar e hidrolizar mediante proteasas a la LF, aboliendo así su efecto bactericida (De Lillo *et al.*, 1996).

5.4.3- Actividad prebiótica y probiótica.

Se considera que la LF puede actuar como prebiótico, favoreciendo el crecimiento intestinal de bifidobacterias y lactobacilos (Petschow & Talbott, 1991; Kim *et al.*, 2004; Coppa *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2010). Así por ejemplo algunos estudios indican que la LF podría favorecer el crecimiento de bacterias lácticas probióticas capaces de aprovechar el hierro de la LF, actuando a modo de sideróforo (Petschow *et al.*, 1999). No obstante, es un tema controvertido y se considera que están implicados otros mecanismos aún no bien conocidos. Algunas de las bacterias probióticas que se ha descrito que pueden ver estimulado su crecimiento por la LF son *Lactobacillus*

acidophilus, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici* y *Bifidobacterium lactis* (Tian *et al.*, 2010), pero sin embargo otros estudios no han encontrado efecto alguno de la LF sobre estos mismos microorganismos (Griffiths *et al.*, 2003; Sherman *et al.*, 2004), y otros estudios incluso apuntan un posible efecto adverso o inhibidor por parte de la LF sobre ciertas bacterias lácticas, como *Streptococcus thermophilus* (Franco *et al.*, 2010). Y por otro lado se considera que la LF podría tener un efecto probiótico, ya que puede actuar a nivel intestinal favoreciendo el crecimiento y diferenciación de los enterocitos, asegurando una correcta absorción y secreción intestinal, reforzando el sistema inmune a nivel sistémico y local, e impidiendo la colonización por microorganismos entéricos patógenos como *E. coli* y *Salmonella* (Griffiths *et al.*, 2003; Sherman *et al.*, 2004; Buccigrossi *et al.*, 2007; Manzoni *et al.*, 2011).

5.4.4- Inhibición de la adhesión y colonización bacteriana en superficies, y de la invasión de células hospedadoras.

La lactoferrina, tanto en su apoforma como en su holoforma, podría actuar inhibiendo la capacidad de las bacterias para adherirse, colonizar superficies y formar biofilms (Singh *et al.*, 2002). Esta actividad es independiente de la actividad quelante de hierro, y se cree que está mediada por el extremo C-terminal de la molécula de LF (Oho *et al.*, 2002). Este efecto fue descrito por primera vez para *Streptococcus mutans* sobre superficies de hidroxiapatita (imitando la superficie dental) por Visca *et al.* (1989). Los mecanismos de actuación propuestos por los que la LF podría inhibir la adhesión microbiana son:

- Interacción de la LF con glucosaminoglicanos (GAGs), adhesinas y heparán sulfato (HS) de la superficie microbiana o de la superficie a colonizar (Wu *et al.*, 1995a; Shimazaki *et al.*, 1998).
- Interacción de la LF con receptores de superficie e invasinas de las células integrantes de mucosas, epitelios y superficies (Longhi *et al.*, 1993; Di Biase *et al.*, 2004).
- Actividad proteolítica de la LF, que degradaría factores de colonización, proteínas transportadoras, adhesinas y proteínas de superficie microbiana (Qiu *et al.*, 1998; Plaut *et al.*, 2001; Hendrixson *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2003).

Esta actividad inhibidora de la LF sobre la adhesión microbiana y/o formación de biofilms se ha observado en muy diversos géneros y especies, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Alugupalli & Kalfas, 1997), *Burkholderia cenocepacia* (Ammendolia *et al.*, 2010), *E. coli* enteroagregativa, enteropatogénica y enterotoxigénica (Longhi *et al.*, 1993; Kawasaki *et al.*, 2000; Nascimento de Araujo & Giugliano, 2000,2001), *Helicobacter felix* (Dial & Lichtenberger, 2002), *Prevotella*

nigrescens y *Prevotella intermedia* (Alugupalli & Kalfas, 1997; Hirano *et al.*, 2000), *P. aeruginosa* (Williams *et al.*, 2003; Leid *et al.*, 2009) y *Xylella fastidiosa* (Toney & Koh, 2006).

Además la LF podría ser capaz de inhibir la entrada y colonización en células hospedadoras de parásitos intracelulares facultativos gram positivos y gram negativos. Esta actividad sería también independiente de la actividad quelante de hierro. Los mecanismos de actuación propuestos hasta la fecha son:

- Interacción de la LF con integrinas y GAGs de la célula hospedadora, impidiendo así la interacción de las invasinas microbianas con la célula hospedadora e inhibiendo su internalización.
- Captación e internalización de la LF por la célula hospedadora, de modo que la LF podría alcanzar el núcleo, uniéndose después a una secuencia específica de ADN y activando la transcripción de ciertos genes. Así, la LF podría actuar a través de la regulación génica sobre algunas funciones de las células epiteliales (por ejemplo de intestino) que incluyen el agrupamiento y ordenación del citoesqueleto, ambas funciones cruciales para la internalización bacteriana (Ashida *et al.*, 2004).

Esta actividad inhibidora de la colonización o invasión microbiana en células hospedadoras se ha descrito para bacterias gram negativas, como *E. coli* enteroinvasiva (Longhi *et al.*, 1993; Di Biase *et al.*, 2004), *S. typhimurium* (Bessler *et al.*, 2006), *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* (Di Biase *et al.*, 2004) y *Shigella* spp. (Willer Eda *et al.*, 2004), y para gram positivas, como *L. monocytogenes* (Antonini *et al.*, 1997), *Streptococcus pyogenes* (Ajello *et al.*, 2002) y *S. aureus* (Diarra *et al.*, 2003).

Tabla 4. Actividad microbiciada observada *in vitro* (en condiciones de laboratorio) para la LF y algunos de sus derivados, en distintos medios o sustratos, por distintos autores.

Microorganismo	Reactivo	Medio	Sensibilidad	Referencia
<i>Actinobacillus</i>	hLF	Solución salina	+	Kalmar & Arnold, 1988
<i>actinomycetemcomitans</i>				
<i>Actinobacillus</i>	hLF y bLF	BM1	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>actinomycetemcomitans</i>				
<i>Actinobacillus</i>	hLF y bLF	Agar sangre	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>actinomycetemcomitans</i>				
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	bLF	CDM	-	Ammendolia <i>et al.</i> , 2010
<i>Citrobacter diversus</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Citrobacter freundii</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Enterobacter aerogenes</i>	LFC	Peptona	-	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Enterobacter cloacae</i>	hLF	Solución salina	-	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Enterobacter cloacae</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Enterobacter intermedius</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Enterobacter sp.</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Escherichia coli</i> no EP	hLF	Solución salina	+	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Escherichia coli</i>	bLF y PDLF	PYG	+ y +	Tomita <i>et al.</i> , 1991
<i>Escherichia coli</i>	bLF y LFC	Peptona	+ y +	Bellamy <i>et al.</i> , 1992a
<i>Escherichia coli</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Escherichia coli</i>	LFC	Peptona	+	Ellison, 1994
<i>Escherichia coli</i>	bLF, PDLF y LFC	Peptona	+, + y +	Shin <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i>	bLF, PDLF y LFC	PYG	+, + y +	Shin <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i>	LFC	Peptona	+	Vorland <i>et al.</i> , 1999
<i>Escherichia coli</i>	hLF y bLF	BHI	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Escherichia coli</i>	hLF y bLF	Agar sangre	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Escherichia coli</i>	PDLF	PYG	+	Chantaysakorn & Richter, 2000
<i>Escherichia coli</i>	PDLF	Zumo zanahoria	-	Chantaysakorn & Richter, 2000
<i>Escherichia coli</i>	bLF, LFC y PDLF	Fosfato	-, - y -	Masschalck <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i>	LFC	Peptona	+	Ulvatne & Vorland, 2001
<i>Escherichia coli</i>	hLF	PBS-Tw	+	Nibbering <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i>	hLF	Fosfato-TSB1%	-	Ulvatne & Vorland, 2001
<i>Escherichia coli</i>	LFC	Peptona	+	Ulvatne <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia coli</i>	bLF	Fosfato	+	Van der Kraan <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia coli</i>	hLF y cLF	Fosfato	+ y +	Berlov <i>et al.</i> , 2007
<i>Escherichia coli</i>	bLF y AMILF	Fosfato	- y +	Pan <i>et al.</i> , 2007b
<i>Escherichia coli</i>	bLF y LFC	Fosfato	+ y +	López-Expósito <i>et al.</i> , 2008
<i>Escherichia coli</i>	bLF y pLF	Caldo nutritivo	+ y -	Ramos-Clamont <i>et al.</i> , 2010
<i>Escherichia coli</i> O104:H21	PDLF	PYG	+	Branen & Davidson, 2000
<i>Escherichia coli</i> O104:H21	PDLF	TSB	-	Branen & Davidson, 2000
<i>Escherichia coli</i> O111	hLF	Solución salina	-	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Escherichia coli</i> O111	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Escherichia coli</i> O111	hLF	Peptona	-	Odell <i>et al.</i> , 1996
<i>Escherichia coli</i> O126:B16	hLF	Solución salina	-	Arnold <i>et al.</i> , 1977,1980
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	LFC	Peptona	+	Venkitanarayanan <i>et al.</i> , 1992
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	LFC	Carne picada	- ($\downarrow < 0.8$ log)	Venkitanarayanan <i>et al.</i> , 1992
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	PDLF	PYG	+	Branen & Davidson, 2000
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	PDLF	TSB	+	Branen & Davidson, 2000
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	bLF, LFC y PDLF	Fosfato	-, - y +	Masschalck <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	bLF y hLF	Solución salina	+ y +	Griffiths <i>et al.</i> , 2003
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	bLF	Fosfato	+	Van der Kraan <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	bLF	PYG	-	Murdock <i>et al.</i> , 2007
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	hLF y bLF	Cultivo celular (Caco-2)	+ y + \downarrow invasión	Atef Yekta <i>et al.</i> , 2010
<i>Escherichia coli</i> EHEC	bLF y LFC	LB broth	+ y +	Flores-Villaseñor <i>et al.</i> , 2010
<i>Escherichia coli</i> EPEC	bLF y LFC	LB broth	+ y +	Flores-Villaseñor <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	hLF y bLF	Agar sangre	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	hLF y bLF	Agar sangre	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Helicobacter pylori</i>	bLF y rhLF	BHI	- y -	Huynh <i>et al.</i> , 2009

Continuación de Tabla 4

Microorganismo	Reactivo	Medio	Sensibilidad	Referencia
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	bLF y PDLF	PYG	- y +	Tomita <i>et al.</i> , 1991
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	bLF y LFC	Peptona	- y +	Bellamy <i>et al.</i> , 1992a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	hLF y bLF	BHI	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	hLF y bLF	Agar sangre	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	hLF	PBS-Tw	+	Nibbering <i>et al.</i> , 2001
<i>Legionella pneumophila</i>	hLF	Agua desionizada	+	Bortner <i>et al.</i> , 1986
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	hLF	Fosfato	+	Aguilera <i>et al.</i> , 1998
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	hLF y bLF	BM1	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	hLF y bLF	Agar sangre	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	bLF	Fosfato	-	Van der Kraan <i>et al.</i> , 2004
<i>Prevotella intermedia</i>	hLF	Fosfato	-	Aguilera <i>et al.</i> , 1998
<i>Prevotella intermedia</i>	hLF	Tris	-	Duchesne <i>et al.</i> , 1999
<i>Prevotella intermedia</i>	hLF y bLF	BM1	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Prevotella intermedia</i>	hLF y bLF	Agar sangre	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Prevotella nigrescens</i>	hLF	Fosfato	-	Aguilera <i>et al.</i> , 1998
<i>Prevotella nigrescens</i>	hLF	Tris	-	Duchesne <i>et al.</i> , 1999
<i>Proteus mirabilis</i>	LFC	Peptona	-	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Proteus rettgeri</i>	LFC	Peptona	-	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Proteus sp.</i>	LFC	Peptona	-	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Proteus vulgaris</i>	bLF y PDLF	PYG	- y +	Tomita <i>et al.</i> , 1991
<i>Proteus vulgaris</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Proteus vulgaris</i>	LFC	Peptona	-	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	hLF	Solución salina	+	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	bLF y PDLF	PYG	- y +	Tomita <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	bLF y LFC	Peptona	- y +	Bellamy <i>et al.</i> , 1992a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LFC	Peptona	-	Ellison, 1994
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	bLF	Fosfato	+	Van der Kraan <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	hLF	Cultivo neutrófilos	+	Leid <i>et al.</i> , 2009
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	hLF	Tris	+	Andrés & Fierro, 2010
<i>Pseudomonas cepacia</i>	LFC	Peptona	-	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LFC	PYG	-	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	bLF, LFC y PDLF	Fosfato	-, - y -	Masschalck <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	bLF y AMILF	Fosfato	- y +	Pan <i>et al.</i> , 2007a,b
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	apo-, holo- y bLF	LB	+, + y +	Kim <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas fragi</i>	bLF y AMILF	Fosfato	+ y +	Pan <i>et al.</i> , 2007b
<i>Pseudomonas putida</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas syringae</i>	apo-, holo- y bLF	LB	+, + y +	Kim <i>et al.</i> , 2008
<i>Salmonella abony</i>	bLF	SPYE	-	Naidu & Arnold, 1994
<i>Salmonella choleraesuis</i>	bLF y LFC	Fosfato	+ y +	López-Expósito <i>et al.</i> , 2008
<i>Salmonella dublin</i>	bLF	SPYE	+	Naidu & Arnold, 1994
<i>Salmonella Enteritidis</i>	bLF y PDLF	PYG	- y +	Tomita <i>et al.</i> , 1991
<i>Salmonella Enteritidis</i>	LFCF	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Salmonella Enteritidis</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Salmonella Enteritidis</i>	bLF y LFC	Peptona	- y +	Facon & Skura, 1996
<i>Salmonella Enteritidis</i>	bLF y LFC	TSB	- y -	Facon & Skura, 1996
<i>Salmonella Enteritidis</i>	PDLF	PYG	+	Branen & Davidson, 2000
<i>Salmonella Enteritidis</i>	PDLF	TSB	-	Branen & Davidson, 2000
<i>Salmonella Enteritidis</i>	bLF, LFC y PDLF	Fosfato	-, - y -	Masschalck <i>et al.</i> , 2001
<i>Salmonella hartford</i>	bLF	SPYE	-	Naidu & Arnold, 1994
<i>Salmonella kantucky</i>	bLF	SPYE	+	Naidu & Arnold, 1994
<i>Salmonella montevideo</i>	LFC	Peptona	+	Ellison, 1994
<i>Salmonella newport</i>	hLF	Solución salina	-	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Salmonella panama</i>	bLF	SPYE	+	Naidu & Arnold, 1994
<i>Salmonella pullorum</i>	bLF	SPYE	+	Naidu & Arnold, 1994
<i>Salmonella rostock</i>	bLF	SPYE	+	Naidu & Arnold, 1994
<i>Salmonella thompson</i>	bLF	SPYE	+	Naidu & Arnold, 1994
<i>Salmonella typhi</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Salmonella typhimurium</i>	LFC	Peptona	+	Ellison, 1994
<i>Salmonella typhimurium</i>	bLF, LFC y PDLF	Fosfato	-, - y -	Masschalck <i>et al.</i> , 2001
<i>Salmonella typhimurium</i>	bLF y hLF	Solución salina	+ y +	Griffiths <i>et al.</i> , 2003
<i>Salmonella typhimurium</i>	hLF	Cultivo HeLa	- ó adhesión	Bessler <i>et al.</i> , 2006
<i>Salmonella typhimurium</i>	bLF y AMILF	Fosfato	- y +	Pan <i>et al.</i> , 2007b

Continuación de Tabla 4

Microorganismo	Reactivo	Medio	Sensibilidad	Referencia
<i>Salmonella virchow</i>	bLF	SPYE	-	Naidu & Arnold, 1994
<i>Serratia liquefaciens</i>	LFC	Peptona	-	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Serratia marcescens</i>	LFC	Peptona	-	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Serratia sp.</i>	LFC	Peptona	-	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Shigella flexneri</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Shigella flexneri</i>	bLF, LFC y PDLF	Fosfato	-, - y -	Masschalck <i>et al.</i> , 2001
<i>Shigella sonnei</i>	hLF	Solución salina	-	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Shigella sonnei</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Shigella sonnei</i>	bLF, LFC y PDLF	Fosfato	-, - y -	Masschalck <i>et al.</i> , 2001
<i>Vibrio cholerae</i>	hLF	Solución salina	+	Arnold <i>et al.</i> , 1977, 1980
<i>Yersinia enterocolitica</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Yersinia enterocolitica</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Yersinia enterocolitica</i>	LFC	PBS	+	Di Biase <i>et al.</i> , 2004
<i>Yersinia enterocolitica</i>	LFC	Cultivo células HEp-2	↑adhesión ↓internalización	Di Biase <i>et al.</i> , 2004
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	apo- y holo-hLF	Agua desionizada	+ y -	Salamah & Al-Obaidi, 1995a,b
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	LFC	PBS	+	Di Biase <i>et al.</i> , 2004
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	LFC	Cultivo células HEp-2	↑adhesión ↓internalización	Di Biase <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus cereus</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Bacillus circulans</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Bacillus natto</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Bacillus sp.</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus subtilis</i>	bLF y PDLF	PYG	+ y +	Tomita <i>et al.</i> , 1991
<i>Bacillus subtilis</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Bacillus subtilis</i>	LFC	Peptona	+	Ulvatne <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus subtilis</i>	bLF	Fosfato	+	Van der Kraan <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus subtilis</i>	bLF y AMILF	Fosfato	+ y +	Pan <i>et al.</i> , 2007a,b
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	bLF y hLF	Solución salina	- y -	Griffiths <i>et al.</i> , 2003
<i>Bifidobacterium infantis</i>	bLF y hLF	Solución salina	- y -	Griffiths <i>et al.</i> , 2003
<i>Clostridium butyricum</i>	bLF y PDLF	Caldo GAM	- y +	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Clostridium clostridioforme</i>	bLF y PDLF	Caldo GAM	+ y +	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Clostridium coccoides</i>	bLF y PDLF	Caldo GAM	+ y +	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Clostridium difficile</i>	bLF y PDLF	Caldo GAM	+ y +	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Clostridium innocuum</i>	bLF y PDLF	Caldo GAM	- y +	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Clostridium paraputrificum</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Clostridium paraputrificum</i>	bLF y PDLF	Caldo GAM	- y +	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Clostridium perfringens</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Clostridium perfringens</i>	bLF y PDLF	Caldo GAM	- y -	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Clostridium ramosum</i>	bLF y PDLF	Caldo GAM	- y +	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Corynebacterium diptheriae</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Corynebacterium renale</i>	LFC	PYG	-	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Enterococcus faecalis</i>	LFC	PYG	-	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Enterococcus faecalis</i>	bLF y AMILF	Fosfato	- y +	Pan <i>et al.</i> , 2007b
<i>Enterococcus sp.</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	bLF y hLF	Solución salina	- y -	Griffiths <i>et al.</i> , 2003
<i>Lactobacillus casei</i>	hLF	Solución salina	-	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Lactobacillus casei</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	bLF	Yogur	- (↓<0.5 log)	Franco <i>et al.</i> , 2010
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	hLF	Tris	+	Andrés & Fierro, 2010
<i>Listeria monocytogenes</i>	bLF y PDLF	PYG	+ y +	Tomita <i>et al.</i> , 1991
<i>Listeria monocytogenes</i>	bLF y LFC	Peptona	+ y +	Bellamy <i>et al.</i> , 1992a
<i>Listeria monocytogenes</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Listeria monocytogenes</i>	LFC	Peptona	+	Wakabayashi <i>et al.</i> , 1992
<i>Listeria monocytogenes</i>	LFC	Peptona	+	Ellison, 1994
<i>Listeria monocytogenes</i>	PDLF	PYG	+	Branen & Davidson, 2000
<i>Listeria monocytogenes</i>	PDLF	TSB	-	Branen & Davidson, 2000
<i>Listeria monocytogenes</i>	hLF	PBS-Tw	+	Nibbering <i>et al.</i> , 2001
<i>Listeria monocytogenes</i>	bLF y LFC	Cultivo macrófagos (THP-1)	- y + ↓invasión	Longhi <i>et al.</i> , 2004
<i>Listeria monocytogenes</i>	hLF y cLF	Fosfato	+ y +	Berlov <i>et al.</i> , 2007
<i>Listeria monocytogenes</i>	bLF	PYG	+	Murdock <i>et al.</i> , 2007
<i>Listeria monocytogenes</i>	bLF y AMILF	Fosfato	- y +	Pan <i>et al.</i> , 2007b
<i>Listeria monocytogenes</i>	bLF y LFC	Fosfato	+ y +	López-Expósito <i>et al.</i> , 2008

Continuación de Tabla 4

Microorganismo	Reactivo	Medio	Sensibilidad	Referencia
<i>Micrococcus</i> sp.	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Staphylococcus aureus</i>	hLF	Solución salina	-	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Staphylococcus aureus</i>	bLF y LFC	Peptona	+ y +	Bellamy <i>et al.</i> , 1992a
<i>Staphylococcus aureus</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Staphylococcus aureus</i>	LFC	Peptona	+	Ellison, 1994
<i>Staphylococcus aureus</i>	LFC	Peptona	+	Vorland <i>et al.</i> , 1999
<i>Staphylococcus aureus</i>	hLF y bLF	BHI	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Staphylococcus aureus</i>	hLF y bLF	Agar sangre	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Staphylococcus aureus</i>	bLF, LFC y PDLF	Fosfato	-, - y -	Masschalck <i>et al.</i> , 2001
<i>Staphylococcus aureus</i>	hLF	PBS-Tw	+	Nibbering <i>et al.</i> , 2001
<i>Staphylococcus aureus</i>	LFC	Peptona	+	Ulvatne & Vorland, 2001
<i>Staphylococcus aureus</i>	bFC	Solución salina	-	Bai <i>et al.</i> , 2010
<i>Staphylococcus aureus</i>	bLF y LFC	LB broth	+ y +	Flores-Villaseñor <i>et al.</i> , 2010
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	hLF	Solución salina	-	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	bLF y LFC	Fosfato	+ y +	López-Expósito <i>et al.</i> , 2008
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Staphylococcus hominus</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Staphylococcus sp.</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Streptococcus bovis</i>	bLF y PDLF	PYG	+ y +	Tomita <i>et al.</i> , 1991
<i>Streptococcus bovis</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Streptococcus cremoris</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Streptococcus lactis</i>	hLF	Solución salina	-	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Streptococcus lactis</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Streptococcus mitior</i>	hLF	Solución salina	+	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Streptococcus mutans</i>	hLF	Solución salina	+	Arnold <i>et al.</i> , 1977, 1980
<i>Streptococcus mutans</i>	hLF	Agua desionizada	+	Arnold <i>et al.</i> , 1981
<i>Streptococcus mutans</i>	hLF	Glicina	+	Arnold <i>et al.</i> , 1981
<i>Streptococcus mutans</i>	hLF	Solución salina	+	Arnold <i>et al.</i> , 1981
<i>Streptococcus mutans</i>	hLF	Fosfato	-	Arnold <i>et al.</i> , 1981
<i>Streptococcus mutans</i>	hLF	Hepes	-	Arnold <i>et al.</i> , 1981
<i>Streptococcus mutans</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Streptococcus mutans</i>	hLF y bLF	BHI	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptococcus mutans</i>	hLF y bLF	Agar sangre	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptococcus mutans</i>	bLF	Fosfato	-	Van der Kraan <i>et al.</i> , 2004
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	hLF	Solución salina	+	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Streptococcus pyogenes</i>	hLF	Solución salina	-	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Streptococcus salivarius</i>	hLF	Solución salina	+	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Streptococcus salivarius</i>	hLF y bLF	BHI	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptococcus salivarius</i>	hLF y bLF	Agar sangre	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptococcus sanguis</i>	bLF	Fosfato	-	Van der Kraan <i>et al.</i> , 2004
<i>Streptococcus sobrinus</i>	hLF y bLF	BHI	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptococcus sobrinus</i>	hLF y bLF	Agar sangre	- y -	Groenink <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LFC	PYG	+	Bellamy <i>et al.</i> , 1992b
<i>Streptococcus thermophilus</i>	bLF	Yogur	- ($\downarrow < 0.5$ log)	Franco <i>et al.</i> , 2010
<i>Candida albicans</i>	hLF	Solución salina	+	Arnold <i>et al.</i> , 1980
<i>Candida albicans</i>	LFC	Peptona	+	Ellison, 1994
<i>Candida albicans</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Candida albicans</i>	bLF y ALF	Caldo SD	- y +	Naidu <i>et al.</i> , 2004a
<i>Candida albicans</i>	bLF y ALF	Cultivo epitelio vaginal	- y +	Naidu <i>et al.</i> , 2004b
<i>Candida albicans</i>	bLF	Fosfato	+	Van der Kraan <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida albicans</i>	hLF	Fosfato	+	Viejo-Díaz <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida glabrata</i>	bLF y ALF	Caldo SD	- y +	Naidu <i>et al.</i> , 2004a
<i>Candida glabrata</i>	bLF y ALF	Cultivo epitelio vaginal	- y +	Naidu <i>et al.</i> , 2004b
<i>Candida parapsilosis</i>	LFC	Peptona	+	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	bLF y AMILF	Fosfato	- y -	Pan <i>et al.</i> , 2007b
<i>Penicillium candidum</i>	bLF y AMILF	Fosfato	- y -	Pan <i>et al.</i> , 2007b

Sensibilidad -/+ , indica ausencia/presencia de actividad microbiciada.

5.4.5- Actividad antivírica.

Diversos estudios atribuyen a la lactoferrina una actividad antiviral. El primero de estos estudios es el de Lu *et al.* (1987), que demostró la actividad de la LF en ratones infectados con el complejo viral FVC-P inductor de policitemia. Posteriormente se ha demostrado su actividad frente a virus con ADN o ARN, así como frente a virus con envoltura o desnudos. Sin embargo no se conoce bien el mecanismo de actuación, siendo las hipótesis más aceptadas:

- Interacción de la LF con la célula hospedadora (Hara *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2004; Waarts *et al.*, 2005), por ejemplo con moléculas de GAGs, heparán sulfato y condroitín-sulfato-proteoglicanos.
- Interacción de la LF con las partículas virales (Marchetti *et al.*, 1996,1998), por ejemplo con proteínas de la envoltura vírica como las proteínas E1 y E2.

No obstante, en ambos casos la actividad antiviral de la LF se basaría más en la prevención o inhibición de la adhesión y fusión viral, y su entrada a la célula hospedadora, más que en una actuación directa de la LF sobre la replicación vírica o sobre el sistema inmune (Van der Strate *et al.*, 2001). Se considera que esta actividad es independiente del hierro y del ácido siálico, y que están implicados los dos lóbulos de la LF (N y C). En general parece ser que la bLF es más eficaz, en cuanto a actividad antivírica se refiere, que la hLF, y la holoforma más que la LF en su apoforma (Valenti *et al.*, 1998). De igual manera, la bLF tiene en general mayor potencia bactericida que la hLF y que otras LFs de eficacia similar (como la canina y la porcina), pero sin embargo liga el hierro más débilmente (Bellamy *et al.*, 1992a; Berlov *et al.*, 2007; Ramos-Clamont *et al.*, 2010).

Hay estudios que demuestran la actividad antiviral de la LF frente a una gran diversidad de virus, tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre éstos se encuentran trabajos que demuestran la eficacia de la LF frente a virus con ARN monocatenario, como calicivirus y poliovirus (Pan *et al.*, 2007a), hantavirus (Murphy *et al.*, 2000), virus de la hepatitis B y C (Yi *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 1998; Hara *et al.*, 2002), influenzavirus (Kawasaki *et al.*, 1993) y virus respiratorio sincitial (Grover *et al.*, 1997), frente a virus con ARN monocatenario retrotranscrito, como el virus de la inmunodeficiencia humana (Harmsen *et al.*, 1995; Swart *et al.*, 1996; Puddu *et al.*, 1998; Berkhout *et al.*, 2004) y felina (Sato *et al.*, 1996), y virus esplénicos SFFV (Hangoc *et al.*, 1987) y frente a virus con ARN bicatenario, como rotavirus (Grover *et al.*, 1997; Superti *et al.*, 1997,2001), y virus con ADN bicatenario, como adenovirus (Dechechi *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2002; Di Biase *et al.*, 2003; Pietrantonio *et al.*, 2003), herpesvirus (Hasegawa *et al.*, 1994; Fujihara & Hayashi, 1995; Marchetti *et al.*, 1996,1998; Siciliano *et al.*, 1999; Seganti *et al.*, 2001; Marchetti *et al.*, 2004) y citomegalovirus (Hasegawa *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1996; Beljaars *et al.*, 2004).

5.4.6- Actividad antifúngica.

Al igual que para las bacterias, en un principio se le atribuyó a la lactoferrina un efecto antifúngico basado en su capacidad para quelar hierro del medio pero posteriormente se le ha atribuido un efecto fungicida, basado en su capacidad para alterar la estructura y permeabilidad de pared y membrana (Viejo-Díaz *et al.*, 2004). Algunos estudios indican incluso que la LF podría actuar mediante estimulación de mecanismos de defensa del hospedador más que por una acción antimicótica directa (Valenti *et al.*, 1986; Nikawa *et al.*, 1993,1995; Wakabayashi *et al.*, 1996; Kuipers *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Viejo-Díaz *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2004).

Existen diversos estudios que describen la actividad antifúngica de la LF frente a mohos y levaduras patógenas, en especial frente a distintas especies de *Candida* como *C. albicans*. Así, se ha observado que la LF y algunos de sus derivados (como la lactoferricina) son activos frente a *C. albicans* (Bellamy *et al.*, 1993) e incluso que la LF tendría un efecto sinérgico en combinación con la lisozima (Samaranayake *et al.*, 1997), pero sin embargo la concentración mínima inhibitoria es muy superior a la de otros antifúngicos existentes.

5.4.7- Actividad antiparasitaria.

Al igual que frente a bacterias, mohos y levaduras, se ha descrito una posible actividad antiparasitaria de la lactoferrina frente a protozoos. De igual manera, el mecanismo de actuación no está completamente caracterizado y podría variar según la especie. Los principales mecanismos de actuación recogidos en la literatura son:

- Interacción de la LF con el hierro del medio, quelándolo y disminuyendo su biodisponibilidad. Este mecanismo se ha descrito para *Pneumocystis carinii* (Weinberg, 1994; Cirioni *et al.*, 2000).
- Interacción de la LF con moléculas cargadas negativamente y/o proteínas de la superficie del parásito. Dicho efecto se ha descrito para los taquizoitos de *Toxoplasma gondii* (Cintra *et al.*, 1986) así como para los esporozoitos de *Eimeria stiedai* y *Trypanosoma brucei* (Omata *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2004), disminuyendo su infectividad *in vivo*.
- Interacción de la LF con receptores de la célula hospedadora, como el heparán sulfato, inhibiendo así la interacción del parásito con la célula. Esto se ha observado para *Plasmodium berghei* y *Plasmodium spp.* (Shakibaei & Frevert, 1996; Sinnis *et al.*, 1996).
- Estimulación de la LF sobre la actividad de los macrófagos del hospedador. Este fenómeno se ha descrito para amastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Lima & Kierszenbaum, 1987).

Otros estudios demuestran una actividad antiparasitaria de la LF sin especificar cuál podría ser su mecanismo de actuación. Así se ha descrito el efecto inhibitorio de la LF sobre el desarrollo intracelular de los amastigotes de *Trypanosoma* (Tanaka *et al.*, 1996) y de *Plasmodium falciparum* (Fritsch *et al.*, 1987), así como un efecto lítico sobre trofozoitos de *Giardia lamblia* (Gillin *et al.*, 1983; Turchany *et al.*, 1995) y de *Entamoeba histolytica* (León-Sicaire *et al.*, 2006). Sin embargo, al igual que para ciertas bacterias la LF podría ser utilizada a modo de sideróforo, mediando la captación e internalización de hierro para ciertos parásitos como *Trichomonas vaginalis* (Lehker & Alderete, 1992) y *Tritrichomonas foetus* (Tachezy *et al.*, 1996,1998). En el caso de los promastigotes de *Leishmania chagasi* se ha observado que éstos son capaces de quelar el hierro de la LF y de la transferrina sérica, pero sin estar implicados sideróforos ni receptores proteicos (Wilson *et al.*, 1994).

5.4.8- Actividad antioxidante.

Esta actividad de la lactoferrina estaría principalmente basada en su capacidad para quelar hierro, ya que éste actúa como catalizador de reacciones de óxido-reducción y generación de radicales libres y de especies oxígeno reactivas o ROS (Cohen *et al.*, 1992). Así, algunos estudios indican que la LF es capaz de reducir los niveles de ROS intracelulares inducidos por la glucosa-oxidasa, inhibiendo así el daño del ADN y la apoptosis celular inducida por estrés oxidativo (Matsue *et al.*, 1994; Actor *et al.*, 2009), mientras que otros proponen su uso como antioxidante en alimentos fácilmente enriquecibles como aceite de maíz y harina de soja (Huang *et al.*, 1999; Steijns & Van Hooijdonk, 2000).

Por otro lado, algunos estudios avalan la hipótesis de un efecto pro-oxidante de la LF según la cual podría favorecer la auto-oxidación de hierro II a hierro III y la formación de H_2O_2 y OH^\cdot . Precisamente éste podría ser el papel de la LF de los gránulos de macrófagos, por el cual la LF ejercería su actividad microbicida (Lassiter *et al.*, 1987; Klebanoff & Waltersdorff, 1990). Este efecto pro-oxidante se ha descrito también en alimentos cuando se añade LF en alta concentración (Nielsen *et al.*, 2004).

5.4.9- Actividad moduladora de la respuesta inmune e inflamatoria.

En condiciones fisiológicas en el organismo se considera que la lactoferrina es un potente modulador de la respuesta inmune e inflamatoria (Bennett & Davis, 1982; Goldman *et al.*, 1982; Håversen *et al.*, 2002; Legrand *et al.*, 2005,2006; Drago-Serrano *et al.*, 2008; Actor *et al.*, 2009; Legrand & Mazurier, 2010), pudiendo actuar como modulador positivo y negativo:

- Como modulador positivo, la LF estimula la liberación de mediadores proinflamatorios como la interleucina 8 (IL-8), el factor de necrosis tumoral α y

el óxido nítrico. Además estimula la actividad citotóxica de las células natural killer (NK) y de las células killer activadas por linfoquinas (LAK) en procesos inflamatorios inducidos por infecciones (Shau *et al.*, 1992). Estimula también la opsonización y la actividad fagocítica y citotóxica de las células polimorfonucleares y macrófagos (Lima & Kierzenbaum, 1987; Szuster-Ciesielska *et al.*, 1995; Miyauchi *et al.*, 1998; Wakabayashi *et al.*, 2003a), y favorece la diferenciación y maduración de los linfocitos B y T (Actor *et al.*, 2009) y de las células dendríticas derivadas de los monocitos (Spadaro *et al.*, 2008).

- Como modulador negativo, la LF estimula la liberación de mediadores antiinflamatorios como la IL-4 y IL-10. Previene el shock séptico mediado por microorganismos gracias a su interacción con el LPS (Zagulski *et al.*, 1989), y al quelar hierro previene la catálisis en la formación de radicales hidroxilo y ROS en procesos inflamatorios.

Además se ha observado en procesos septicémicos y endotóxicos que los niveles de LF en plasma aumentan, debido a la liberación por exocitosis del contenido de los gránulos secundarios de linfocitos y macrófagos; de modo que altos niveles de LF en plasma pueden considerarse como un indicador temprano de estos procesos.

5.4.10- Actividad antitumoral.

Se ha demostrado la presencia de altos niveles de lactoferrina en procesos tumorales, y se piensa que su papel antitumoral podría estar relacionado con distintos mecanismos (Van Belzen, 2002; Rodrigues *et al.*, 2009; Tsuda *et al.*, 2010) como:

- Modulación del sistema inmune y estimulación de la liberación de IL-18 y de γ -interferón.
- Inducción de la entrada de las células tumorales en fase G1/S (Damien *et al.*, 1999; Breton *et al.*, 2004).
- Inducción de la apoptosis de las células tumorales a través de la modulación de la expresión génica y de la activación de la ruta de señales Fas (Fujita *et al.*, 2004a,b; Matsuda *et al.*, 2007), y de la activación de las caspasas (Katunuma *et al.*, 2006).
- Inhibición de la angiogénesis.

De este modo, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la LF podría ser capaz de inhibir la tumorigénesis en distintos órganos como mama, esófago, lengua, pulmón, hígado y colon (Tsuda *et al.*, 2002; Iigo *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010), y se ha visto que administrada por vía subcutánea es capaz incluso de inhibir el crecimiento de tumores implantados y prevenir la metástasis (Bezault *et al.*, 1994).

Tabla 5. Actividad antimicrobiana observada en diversos ensayos clínicos para la lactoferrina y algunos de sus derivados.

Microorganismo	Reactivo	Especie/Vía	Efecto	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	bLF, hLF y LFC	ratón/oral	↓ en sistema urinario	Håversen <i>et al.</i> , 2000
<i>Escherichia coli</i>	rhLF	rata/oral	↓ en sangre e hígado	Edde <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i>	rhLF	ratón/intragástrica	↓ en intestino	Sherman <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	bLF	ovino/oral	↓ excrección fecal	Atef Yekta <i>et al.</i> , 2011
<i>Escherichia coli</i> ETEC	bLF	ratón/oral	↓ colonización intestinal	Kawasaki <i>et al.</i> , 2000
<i>Helicobacter felis</i>	rhLF	ratón/oral	↓ en estómago	Dial <i>et al.</i> , 2000
<i>Helicobacter pylori</i>	bLF	ratón/oral	↓ en estómago	Wada <i>et al.</i> , 1999; Wang <i>et al.</i> , 2001
<i>Helicobacter pylori</i>	bLF	humana/oral	↓ en estómago	Di Mario <i>et al.</i> , 2003
<i>Helicobacter pylori</i>	bLF y rhLF	ratón/oral	↑ infección e inflamación	Huynh <i>et al.</i> , 2009
<i>Salmonella typhimurium</i>	bLF	Ratón/oral	↓ infección e inflamación	Mosquito <i>et al.</i> , 2010
<i>Shigella flexneri</i>	rhLF	conejo/oral	↓ inflamación intestinal	Gómez <i>et al.</i> , 2002
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	hLF	ratón/IP	↓ infección peritoneal	Salamah & Al-Obaidi, 2005a
<i>Bifidobacterium</i> spp.	bLF	bebés/oral	↑ en intestino	Roberts <i>et al.</i> , 1992
<i>Clostridium innocuum</i>	bLF	ratón/oral	No afecta	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Clostridium paraputrificum</i>	bLF	ratón/oral	↓ excrección fecal	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Clostridium perfringens</i>	bLF	ratón/oral	↓ excrección fecal	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Clostridium ramosum</i>	bLF	ratón/oral	↓ excrección fecal	Teraguchi <i>et al.</i> , 1995a
<i>Clostridium</i> spp.	bLF	bebés/oral	↓ en intestino	Roberts <i>et al.</i> , 1992
<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>	rhLF	ratón/intragástrica	-	Sherman <i>et al.</i> , 2004
<i>Listeria monocytogenes</i>	hLF	ratón/oral	↓ en hígado pero no en bazo	Lee <i>et al.</i> , 2005
<i>Staphylococcus aureus</i>	bLF	ratón/oral	↓ en sangre y riñón	Bhimani <i>et al.</i> , 1999
Flora intestinal humana	bLF	ratón/oral	↑ <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> y aerobios en ID	Hentges <i>et al.</i> , 1992
<i>Candida albicans</i>	bLF	ratón/oral	↓ en boca	Takakura <i>et al.</i> , 2003
Virus de la influenza	bLF	ratón/oral	- pero ↓ inflamación pulmonar	Shin <i>et al.</i> , 2005
Virus del herpes simple I	bLF	ratón/oral	- pero mejora el estado general	Wakabayashi <i>et al.</i> , 2004
<i>Toxoplasma gondii</i>	LFC	ratón/oral e IP	↑ supervivencia	Isamida <i>et al.</i> , 1998
<i>Trichophyton</i> spp.	bLF, hLF y LFC	cobaya/oral	↓ niveles	Wakabayashi <i>et al.</i> , 2000

Efecto -, indica ausencia de efecto sobre el microorganismo.

5.4.11- Actividad osteoblástica.

Se considera que la lactoferrina además de tener efectos mitogénicos sobre células como enterocitos, linfocitos B y T, y macrófagos, podría actuar como regulador de la morfogénesis de órganos y de tejido óseo. Hay estudios que indican que la LF podría favorecer la proliferación y diferenciación de osteoblastos, e inhibir su apoptosis. Se cree que no afecta a los osteoclastos maduros pero sí que inhibe el desarrollo y maduración de las células precursoras de osteoclastos, inhibiendo la resorción ósea. En base a esto se considera que la administración de LF podría representar una alternativa para el tratamiento de la osteoporosis y otras patologías óseas, y para favorecer la regeneración ósea (Lorget *et al.*, 2002; Cornish *et al.*, 2004, Naot *et al.*, 2005; Cornish *et al.*, 2006; Amini & Nair, 2011; Malet *et al.*, 2011).

5.4.12- Actividad enzimática y proteolítica.

Como ya se indicó en el apartado de la actividad de “inhibición de la adhesión y colonización bacteriana”, la lactoferrina podría desempeñar una actividad proteolítica (probablemente de serín-proteasa) sobre factores de adhesión, colonización y virulencia microbianos. Se cree que esta actividad proteolítica se localiza en el lóbulo N de la molécula de LF, y que actuaría principalmente sobre regiones ricas en arginina (Hendrixson *et al.*, 2003). En condiciones *in vitro* se ha observado, para la actividad proteolítica de la LF, una especificidad de sustrato similar a la de la tripsina, que se ve inhibida por inhibidores de serín-proteasas. Mediante columnas de afinidad de serín-proteasas se ha visto que menos de un 10% de las moléculas de LF poseen esta actividad proteolítica (Massucci *et al.*, 2004).

Se ha observado en *Haemophilus influenzae* que la LF degrada a la proteasa microbiana IgA1 y la adhesina Hap, atenuando así su virulencia y capacidad de colonización (Plaut *et al.*, 1992; Qiu *et al.*, 1998; Plaut *et al.*, 2001). En *S. flexneri* es capaz de degradar los antígenos plasmídicos IpaB e IpaC, inhibiendo así su entrada en la célula hospedadora (Gomez *et al.*, 2001,2002,2003). En *E. coli* enteropatogénica es capaz de degradar las proteínas bacterianas EspA, EspB y EspD, inhibiendo así la hemólisis y la adherencia sobre las células hospedadoras (Ochoa *et al.*, 2003; Ochoa & Cleary, 2004; Ochoa *et al.*, 2004).

Otros estudios indican que además la LF podría presentar distintas isoformas que podrían interaccionar con ligandos específicos y ejercer distintas actividades enzimáticas, como actividad de ribonucleasa (Furmanski *et al.*, 1989; Ramaswamy *et al.*, 1993; Devi *et al.*, 1994) favoreciendo la hidrólisis y degradación del ADN y ARN microbianos (Zhao & Hutchens, 1994; Ye *et al.*, 2000), ATPasa, fosfatasa e hidrolasa de malto-oligosacáridos (Kanyshkova *et al.*, 2003). De momento se han aislado tres isoformas de LF en leche (alfa, beta y gamma), siendo la α -LF la forma capaz de ligar hierro mientras que la β -LF y la γ -LF no ligan hierro pero tienen actividad enzimática.

5.4.13- Absorción intestinal de hierro.

La lactoferrina podría desempeñar un papel nutricional interviniendo en la absorción intestinal de hierro (De Vet & Van Vugt, 1971) y es capaz de interaccionar con receptores específicos intestinales (Suzuki *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2008), por lo que se ha propuesto su uso como vehículo en la suplementación de hierro en procesos como la anemia microcítica hipocrómica (Fransson *et al.*, 1983a; Kawakami *et al.*, 1988,1993). No obstante, este posible papel de la LF en la absorción intestinal de hierro es un tema bastante controvertido, y así hay estudios que indican que la suplementación con LF no mejora la absorción o biodisponibilidad de hierro, ni en animales (Fransson *et al.*, 1983a,b; Kawakami *et al.*, 1988; Davidson *et al.*, 1990) ni en

humanos (Fairweather-Tait *et al.*, 1987; Schulz-Lell *et al.*, 1991), e incluso hay estudios que indican que la LF podría inhibir la absorción de hierro (Brock, 1980). Actualmente la hipótesis más aceptada es que la LF está implicada en el metabolismo del hierro, pero no a nivel de su absorción intestinal sino como regulador en situaciones patológicas en las que los niveles de hierro aumentan en el organismo al ser liberado o movilizado de sus depósitos.

5.4.14- Actividad moduladora de la coagulación

La lactoferrina es capaz de interaccionar con polianiones y GAGs, principalmente por su extremo N-terminal rico en argininas (Van Berkel *et al.*, 1997), por lo que podría interaccionar con la heparina. Como consecuencia de esta interacción, la heparina se vería neutralizada e inactivada y su actividad anticoagulante resultaría bloqueada (Wu *et al.*, 1995b).

5.4.15- Activación transcripcional

Hay estudios que indican que la lactoferrina podría ser capaz de penetrar en las células, alcanzando el núcleo y uniéndose entonces a una secuencia específica del ADN, actuando así como un factor activador de la transcripción (Bennet *et al.*, 1986; Fleet, 1995; He & Furmanski, 1995; Kanyshkova *et al.*, 1999).

5.4.16- Otras actividades

Entre ellas podemos mencionar:

- Modulación de la angiogénesis. La LF podría regular la neovascularización mediante la modulación de factores como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento endotelial (VEGF) y la interleucina IL-18 (Shimamura *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Mader *et al.*, 2006; Amini & Nair, 2011).
- Modulación del metabolismo lipídico. La LF podría actuar disminuyendo los niveles plasmáticos de triglicéridos y ácidos grasos, así como de colesterol hepático (Takeuchi *et al.*, 2004), reduciendo el acúmulo de grasa visceral y ejerciendo un efecto antiadipogénico, que podría ser útil en el tratamiento de la obesidad (Ono *et al.*, 2010). Otros estudios indican que además reduce los niveles de grasa y triglicéridos en piel, por lo que podría ser útil para el tratamiento del acné (Kim *et al.*, 2010).
- Regulación de la mielopoyesis. Éste es un efecto bastante controvertido y que aún no se conoce bien, pero algunos estudios indican que podría estar mediado por la liberación de corticosteroides a nivel de las glándulas

adrenales inducida por la LF (Broxmeyer & Platzer, 1984; Artym & Zimecki, 2007; Zimecki *et al.*, 2009).

- Efecto analgésico. Igualmente es un efecto controvertido y poco estudiado, pero algunos estudios indican que la LF podría tener un efecto analgésico, antinocioceptivo y/o potenciador de analgésicos opioides, quizás mediante un mecanismo mediado por el óxido nítrico (Hayashida *et al.*, 2003,2004; Tsuchiya *et al.*, 2006).
- Regeneración cutánea. La LF podría ayudar a la reparación cutánea y de heridas, mediante la inducción de síntesis de GAGs (como el hialuronato) y de colágeno tipo I por fibroblastos, así como favoreciendo la proliferación y movilidad de éstos (Tang *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2011).

5.5- Aplicaciones comerciales y usos actuales.

Como consecuencia de todas las posibles actividades anteriormente descritas, actualmente se considera a la lactoferrina como una proteína multifuncional con una gran variedad de usos y aplicaciones. A nivel industrial se obtiene principalmente a partir de suero de quesería y leche, en los que aparece con una concentración media de 0.05 mg/ml y 0.16 mg/ml respectivamente, alcanzando en queso un nivel medio de unos 0.99 mg/g (Dupont *et al.*, 2006). Los métodos para el aislamiento y purificación de la LF a partir de estos productos están basados en el carácter catiónico de la proteína, empleando técnicas de cromatografía de intercambio iónico o absorción en membranas ácidas, como:

- cromatografía de separación en columnas CM-sephadex
- cromatografía de afinidad en columnas Cibachron Blue-sepharose
- cromatografía de afinidad en columnas de heparina “cross-linked”
- cromatografía de afinidad en columnas de ADN-agarosa

Existen además métodos que permiten la desaturación de hierro de la LF, es decir, la transformación de la holoforma en apoforma, como:

- diálisis en acetato y filtración en gel
- diálisis en ácido cítrico
- filtración en columnas de resinas iónicas

Una vez aislada y purificada, la LF se concentra, ultrafiltra, pasteuriza y liofiliza, obteniéndose finalmente un producto con un 95% de pureza (Tomita *et al.*, 2002). Se está desarrollando un método para la obtención y purificación de LF en su apoforma, basado en la aplicación de pulsos eléctricos en medios con alta fuerza iónica, que podría incluso permitir la modificación de las propiedades físicoquímicas de la molécula (Sui *et al.*, 2010).

En la actualidad la LF bovina se produce a nivel industrial, superando las 60 t/año, por compañías como Armor Proteins en Francia, DMV International Nutritionals en los Países Bajos, DOMO en Bélgica, Fonterra y Tatua Nutritionals en Nueva Zelanda, Glanbia Nutritionals for Life en Wisconsin (USA), MG Nutritionals en Australia, MILEI en Alemania, Morinaga Milk Industry en Japón y NutriScience Innovations en Connecticut (USA). Existen además compañías biofarmacéuticas dedicadas a la producción de LF recombinante humana (rhLF), como Agennix en Texas (USA), Pharming en los Países Bajos y Ventria Bioscience en Carolina del Norte (USA). Los sistemas de expresión para esta rhLF son muy variados, e incluyen animales (como ratones, conejos, vacuno, ovino, aves e insectos), vegetales (como arroz, maíz, cebada, ginseng, patata, tomate y tabaco), mohos (como *Aspergillus*, *Saccharomyces* y *Pichia*), virus (como Baculovirus y Pseudoadenovirus), y cultivos *in vitro* de células vegetales y animales (Conesa *et al.*, 2010).

Entre los distintos estudios que se están realizando sobre la LF de cara a su aplicación en distintos campos y posibles aplicaciones terapéuticas, se encuentran:

- Antimicrobiano en humana y veterinaria. Diversos estudios parecen indicar que la administración por vía oral de LF podría reducir las infecciones bacterianas gastrointestinales (Teraguchi *et al.*, 1995a,b; Wada *et al.*, 1999; Di Mario *et al.*, 2003; Sherman *et al.*, 2004; Teraguchi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005) e incluso las causadas por protozoos (Isamida *et al.*, 1998). Así por ejemplo, un reciente estudio en ratones infectados experimentalmente con *S. typhimurium* indica que la LF por vía oral podría ser capaz de disminuir la mortalidad, los síntomas clínicos, las lesiones en mucosa intestinal, y la inflamación de distintos órganos como hígado, cerebro, bazo e intestino (Mosquito *et al.*, 2010). Sin embargo, la administración de LF por vía intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, probablemente presentaría escaso o nulo efecto, ya que la LF es rápidamente eliminada del organismo, aunque existe un estudio que indica que la administración intravenosa de la LF en ratones podría tener un efecto protector frente a dosis letales de *E. coli* (Zagulski *et al.*, 1989). La LF podría así emplearse como antibiótico natural o incluso como potenciador del efecto de otros agentes antimicrobianos naturales (como la lisozima o la lactoperoxidasa) o sintéticos ya empleados y/o frente a los que los microorganismos han desarrollado ya resistencias, como la eritromicina, minociclina, rifampicina y cloranfenicol (Soukka *et al.*, 1991; Chimura *et al.*, 1993; Naidu & Arnold, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1996; Fowler *et al.*, 1997; Vorland *et al.*, 1999b; Wakabayashi *et al.*, 2002).
- Prevención y tratamiento de sepsis y diarreas neonatales. Basándose en la actividad antimicrobiana de la LF, así como en su capacidad para promover la

proliferación de bacterias beneficiosas como *Lactobacillus* y bifidobacterias, se están llevando a cabo estudios para su administración en el tratamiento de infecciones intestinales pediátricas (Ochoa & Cleary, 2009). En un estudio (Manzoni *et al.*, 2009) realizado en la Unidad de Neonatología y Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital de Santa Ana (en Turín, Italia) se investigó la capacidad de la LF (acompañada o no del probiótico *Lactobacillus rhamnosus*, LGG) para prevenir la sepsis neonatal. Este estudio se realizó sobre 472 neonatos de menos de 1.5 kg, de los cuales 153 recibieron bLF (100 mg/día) por vía oral, 151 recibieron bLF combinada con LGG, y el resto recibió un placebo. El tratamiento se aplicó durante 30-40 días, dando como resultado 45 casos de sepsis tardía; pero la incidencia fue menor en los neonatos que recibieron el tratamiento de bLF sola o combinada con LGG (5%) que en los que recibieron el placebo (17%). Los casos que aparecieron de sepsis se debieron tanto a bacterias como a mohos, no aparecieron efectos adversos ni intolerancias, y la mortalidad fue nula en el grupo de neonatos que recibieron tratamiento, frente al 5% en el grupo placebo.

- Aditivo para la seguridad de los alimentos. Se está investigando el posible empleo de la LF en alimentos, como por ejemplo como integrante de envases bioactivos. Así, la LF combinada con lisozima e incorporada en películas de quitosano podría ser capaz de disminuir la carga microbiana en alimentos en magnitud similar a la del EDTA, esto es en 3 unidades logarítmicas para *L. monocytogenes* y en casi 0.5 unidades para *E. coli* O157:H7 (Brown *et al.*, 2008). Actualmente, en Estados Unidos la bLF está reconocida como GRAS y está permitido su uso en forma de spray (en concentración inferior o igual al 2 %) sobre canales y piezas cárnicas con fines antimicrobianos, siempre que se aplique en concentraciones inferiores a 0.2 ml/kg para canales, 0.56 ml/kg para piezas cárnicas y 2.5 ml/kg para cortes cárnicos. Todos estos productos deben, no obstante, ser etiquetados como tales y ser sometidos a los procesos o tratamientos habituales de la carne, como lavado con agua o con ácido láctico (Taylor *et al.*, 2004). En Japón está incluida en la “Lista de aditivos alimentarios” y considerada como “aditivo natural permitido”. En la Unión Europea la bLF está considerada como un “nuevo ingrediente alimentario” sometido a la “Nueva Regulación de Alimentos” (EC nº 258/97), que establece un nivel máximo de incorporación a las fórmulas infantiles de 750 mg/kg polvo ó 95 mg/l, y una ingesta diaria entre 40-900 mg/día cuando se añade a otros alimentos destinados a otros grupos poblacionales. Esta regulación implica además que el producto debe llevar indicada la presencia y origen de la LF.
- Otras aplicaciones de la LF sobre las que se está investigando incluyen:

- Tratamiento de procesos cutáneos como dermatitis y dermatofitosis (Wakabayashi *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2000).
- Tratamiento de heridas y úlceras crónicas (como úlceras por diabetes, por presión o varices), aplicada en forma de hidrogel en apósitos y combinada con xilitol (Ammons *et al.*, 2011a).
- Tratamiento de la candidiasis oral (Takakura *et al.*, 2003).
- Prevención del cáncer de colon (Tsuda *et al.*, 2002).
- Tratamiento del cáncer y metástasis (Iigo *et al.*, 1999). Por ejemplo, la Talactoferrina (TLF) de los laboratorios Agennix es una rhLF y se encuentra en la fase 2 de estudios clínicos para evaluar su actividad, eficacia y seguridad por vía oral en pacientes con carcinoma renal metastásico refractario, y de momento parece ser bien tolerada y carecer de toxicidad (Jonasch *et al.*, 2008), y se encuentra en fase I para el tratamiento por vía oral de otros tipos de cáncer y por vía tópica para el tratamiento de úlceras e infecciones (Drago-Serrano, 2007).
- Tratamiento del cáncer y ayuda a la recuperación de pacientes sometidos a quimioterapia. En la actualidad la empresa Fonterra está investigando la administración de LF en helados de cara a la recuperación de pacientes de cáncer y sometidos a quimioterapia. Otras investigaciones están más enfocadas al tratamiento de desórdenes metabólicos, anemias y déficits de hierro en pacientes sometidos a quimioterapia (Macció *et al.*, 2010; Pulina *et al.*, 2010).

En la literatura prácticamente no hay descritos efectos tóxicos de la LF y existen investigaciones clínicas que afirman que no han detectado efectos adversos de la bLF administrada de las siguientes formas (Naidu, 2000):

- En fórmulas infantiles suplementadas con bLF en niveles de 0.1 a 1 g/l y administradas durante 3-5 meses, o en niveles de 2.8 g/l durante 14 días.
- Administrada por vía oral a pacientes de cáncer, en niveles de 1.6 g/día durante 6 meses.
- Administrada por vía oral a ratas y ratones, en niveles de 20 g/l de leche durante 14 días, o en niveles de 20 g/kg de pienso durante 30 semanas.
- Administrada por vía intraperitoneal a ratas, en niveles de 100 mg/kg de peso corporal.

En el caso de la rhLF hay estudios que indican la ausencia de toxicidad administrada en niveles de 2 g/kg de peso corporal/día en ratas, administrada por vía nasogástrica durante 13 semanas (Appel *et al.*, 2006). Por otro lado, hay que tener en cuenta la ingesta habitual de LF procedente de la leche de vaca, que varía entre 10 y 1200 mg/día, considerándose una ingesta media diaria de 73 mg

en niños, 75 mg en adolescentes y 50 mg en adultos, mientras que en lactantes la ingesta diaria de hLF está comprendida entre 1 y 4 g. En base a esto se han establecido unos niveles máximos de ingesta diaria admisible (ADI) para la bLF de 3.6 g para adultos y 2.9 g para niños (EIC, 2001).

El hecho de que LF sea una proteína bioactiva presente en leche, junto con su aparente inocuidad y con las múltiples actividades y aplicaciones que podría tener, ha dado lugar al desarrollo y comercialización de multitud de productos (como se muestra en la Figura 3). Sin embargo, para muchos de estos productos los beneficios o indicaciones señaladas por los fabricantes no han sido aún aprobados por la FDA. Hay que tener en cuenta por tanto que para estos productos no sólo no se ha comprobado aún su efectividad sino tampoco su inocuidad. Y no hay que olvidar que la administración de LF podría dar lugar al desarrollo de alergias e intolerancias, podría estar contraindicada en ciertas infecciones y en ciertas patologías, como se describe al final de esta sección. Entre los distintos productos que contienen LF, que se están comercializando y que no están reconocidos como GRAS por la FDA (al menos de momento) se encuentran:

- Cápsulas y pastillas de LF. Indicadas para su uso como prebiótico, antioxidante, antienvjecimiento, tratamiento de afecciones cutáneas, e incluso para el tratamiento y/o prevención del cáncer.
- Fórmulas y leches infantiles suplementadas con LF. Se comercializan principalmente en Japón, Corea e Indonesia (ya que en estos países la LF está incluida en la lista de aditivos alimentarios permitidos), y están indicadas como prebiótico, para la prevención de sepsis y diarreas neonatales, y para la absorción intestinal de hierro.
- Dentífricos, colutorios y chicles. Indicados para la higiene bucal, para el tratamiento de infecciones como gingivitis y periodontitis, y para el tratamiento de la halitosis y de la xerostomía e hiposialia.
- Bebidas de lácteos y zumos, suplementadas con LF. Indicadas principalmente para su uso en deportistas como prebiótico, antioxidante, antienvjecimiento y antiinflamatorio.
- Tónicos, jabones y cremas. Indicadas para el cuidado de la piel y tratamiento antiacné.
- Cremas y tónicos faciales. Indicados como hidratante, antienvjecimiento, antimanchas, e incluso para la recuperación tras cirugías faciales e implantes de ácido hialurónico.
- Soluciones oftálmicas. Indicadas para el tratamiento de infecciones oculares como blefaritis y conjuntivitis.

- Diversas presentaciones de LF en polvo, ampollas y píldoras. Indicadas para todo lo recogido anteriormente.
- Productos de uso veterinario. Como alimento, reforzador del sistema inmune, potenciador del estado general y prebiótico para perros y peces, para el tratamiento de infecciones óticas en perros y gatos, y de infecciones cutáneas en reptiles (Debbabi *et al.*, 1998; Kakuta, 1998; Sakai *et al.*, 1995).
- Se está comercializando también en la actualidad el “Lacromin” de los laboratorios Ventria Bioscience, que contiene rhLF. Está indicado para su uso como promotor del crecimiento de cultivos celulares *in vitro*.
- En la actualidad los laboratorios Nikken están desarrollando dos formas de presentación de bLF, ambas aún pendientes de aprobar como GRAS por la FDA, que son el “Lactoferrin Gold 1.8™” (indicado como prebiótico, reforzador del sistema inmune, antioxidante y antienvjecimiento) y el “Osteodenx™” (indicado para el refuerzo y regeneración ósea, y tratamiento de la osteoporosis).

Además de todos estos posibles usos o aplicaciones, debido a que en ciertos procesos patológicos e inflamatorios los niveles de LF en el organismo aparecen muy aumentados, se ha propuesto su uso como marcador y herramienta diagnóstica (Cheng *et al.*, 2007; Hayakawa *et al.*, 2009). De este modo, altos niveles de LF en ciertas localizaciones del organismo podrían ser indicativos de procesos como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, cirrosis, ascitis, pancreatitis crónica, mastitis, adenocarcinoma de la glándula parótida, carcinoma prostático, carcinoma folicular de tiroides, carcinoma renal, carcinoma intestinal, carcinoma mamario y metaplasia intestinal.

A pesar de todas estas múltiples aplicaciones de la LF y de su aparente inocuidad o falta de toxicidad, van apareciendo distintos estudios desmintiendo alguno de sus potenciales efectos, o indicando posibles efectos adversos y/o contraindicaciones. Entre éstos encontramos:

- La administración de LF podría estar contraindicada en algunas patologías autoinmunes como el lupus eritematoso, la artritis reumatoide, la colangitis primaria esclerosante y la diabetes tipo 1, que podrían verse exacerbadas por la administración de esta proteína (Taniguchi *et al.*, 2003; Caccavo *et al.*, 2005). También podría dar lugar al desarrollo de procesos alérgicos en individuos sensibles.

81

- La administración de LF podría estar contraindicada en algunos procesos infecciosos, ya que algunos patógenos son capaces de aprovechar la LF como una fuente de hierro, como por ejemplo *C. jejuni* (Miller *et al.*, 2008), *Moraxella* y *Neisseria* (Blanton *et al.*, 1990; Campagnary *et al.*, 1994; Yu & Schrivvers, 2000; Beddek & Schrivvers, 2010), *H. influenzae* (Vogel *et al.*, 1997), *Legionella pneumophila* (Byrd & Horwitz, 1991), *H. pylori* (Dhaenens *et al.*, 1997), *P. aeruginosa* (Xiao & Kisaalita, 1997), *A. hydrophila* (Ascencio *et al.*, 1992), *S. uberis* (Fang & Oliver, 1999) y *S. aureus* (Paulsson *et al.*, 1994), y parásitos como *Leishmania chagasi* (Wilson *et al.*, 1994,2002), *Tritrichomonas foetus* (Grab *et al.*, 2001) y *Toxoplasma gondii* (Dziadek *et al.*, 2005).
- La administración oral y la presencia de LF en saliva favorece la formación de agregados y biofilms de ciertos microorganismos implicados en la placa y caries dental, como *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* (Alugupalli & Kalfas, 1996; Aguilera *et al.*, 1998; Berlutti *et al.*, 2004). De forma similar, *Prevotella nigrescens* y *Prevotella intermedia* son capaces de degradar proteolíticamente la LF y aprovechar el hierro unido a ésta, pudiendo dar lugar a afecciones periodontales como gingivitis y piorrea (Duchesne *et al.*, 1999)
- La administración de LF podría estimular la replicación del virus de la leucemia humana de células T (Moriuchi *et al.*, 2001).
- La bLF y rhLF no sólo no serían eficaces para el tratamiento de úlceras y gastritis por *H. pylori*, sino que *in vitro* e *in vivo* (en ratones) podrían aumentar el crecimiento microbiano y las lesiones e inflamación gástrica (Huynh *et al.*, 2009).
- En pacientes con fibrosis quística, se ha visto que la administración de LF podría disminuir la eficacia o inducir tolerancia de *P. aeruginosa* a antibióticos aminoglicósidos normalmente eficaces frente a este microorganismo, como la tobramicina y gentamicina. Esto podría deberse al cambio en la fisiología bacteriana inducido por la LF, que causa una despolarización de membrana, lo que interferiría en la captación del antibiótico por el microorganismo que depende del potencial eléctrico transmembrana, produciéndose así una tolerancia transitoria al no ser captado el antibiótico y no poder ejercer su acción (Andrés *et al.*, 2005).
- La administración de hLF por vía oral a pacientes con neutropenia sometidos a quimioterapia para el tratamiento de la leucemia, no disminuye la incidencia de aparición de infecciones bacterianas (Trümpler *et al.*, 1989).

- La administración o exposición reiterada a la LF y/o sus derivados podría dar lugar al desarrollo de resistencias. Se ha visto que en condiciones *in vitro*, la exposición bacteriana durante cientos de generaciones a péptidos catiónicos puede inducir el desarrollo de resistencias (Perron *et al.*, 2006). De hecho ya se conocen algunos de los mecanismos de resistencia y adaptación que han desarrollado algunas bacterias frente a ciertos péptidos catiónicos del sistema inmune innato, e incluyen estrategias como cambios en la composición y cargas de la envoltura microbiana, expulsión del péptido mediante bombas de membrana, degradación por proteasas y aumento de la secreción de polisacárido capsular (Peschel, 2002; Ulvatne *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2004).

5.6- Derivados de la lactoferrina.

5.6.1- Lactoferricina.

Cuando la lactoferrina es digerida por la pepsina se generan tres péptidos de menos de 6 kDa, los cuales proceden de la región N-terminal de la LF, tienen carácter básico, puntos isoeléctricos de entre 9.3 y 12.4, y carecen de capacidad para quelar hierro (Dionysius & Milne, 1997). Este hidrolizado de LF con la enzima pepsina (PDLF – “pepsin digested lactoferrin”) se considera que es más resistente a la temperatura que la LF nativa, conservando su poder bactericida tras su autoclavado (a 121 °C durante 15 minutos) y liofilización, mientras que la LF nativa pierde su actividad bactericida tras 5 minutos a 100°C (Tomita *et al.*, 1991). En general se considera que la PDLF tiene una actividad antimicrobiana más potente que la LF y que su espectro es mayor (Bellamy *et al.*, 1992b; Wakabayashi *et al.*, 1992; Yamauchi *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1994). De los tres péptidos que constituyen la PDLF uno de ellos, llamado péptido I, tiene un peso molecular de 3195 Da y es el que se conoce con el nombre de lactoferricina (LFC). El segundo péptido tiene un peso molecular de 2673 Da, y es un heterodímero formado por los residuos 1 a 16 y 43 a 48 de la LF. El tercer péptido tiene un peso molecular de 5851 Da, está constituido por los residuos 1 a 5 y 43 a 47 de la LF formando parte de dos cadenas peptídicas unidas por un puente disulfuro, y presenta una actividad antimicrobiana comparable a la de la LF nativa, siendo el menos potente de los tres péptidos de la PDLF (Dionysius & Milne, 1997). Cuando la LF es ingerida por vía oral parte escapa al ataque de la pepsina en estómago pero otra parte es hidrolizada y digerida (PDLF), coexistiendo la LF, LFC y los otros dos péptidos de la PDLF en el tracto gastrointestinal (Spik *et al.*, 1982), pudiendo aparecer además otros péptidos y formas de LF hidrolizada de manera incompleta (Kuwata *et*

al., 1998). A su vez, se ha visto que la LFC puede ser rápidamente degradada por ciertas bacterias lácticas como *L. delbrueckii* y *S. thermophilus* (Paul & Somkuti, 2010).

La lactoferricina es un péptido catiónico que deriva de la hidrólisis por la pepsina gástrica del lóbulo N de la LF, y consta de 25 residuos aminoacídicos (del 17 al 41 del extremo N-terminal de la LF) en la de origen bovino, mientras que en la de origen humano procede de dos fragmentos de la hLF (del 1 al 11 y del 12 al 47) unidos entre sí por un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína (Dionysius & Milne, 1997; Wakabayashi *et al.*, 2003b), y presenta una α -hélice y una β -lámina. Además de en el tracto digestivo, la LFC se ha observado en otras localizaciones como secreciones mucosas y fluido broncoalveolar de pacientes con fibrosis quística y con otras patologías pulmonares crónicas, pero no se sabe de dónde procede o si se genera allí mismo (Ghafouri *et al.*, 2002), y además se han encontrado también altos niveles de LF nativa (Thompson *et al.*, 1990). Diversos estudios indican que su actividad y espectro bactericida son mayores (entre 3 y 25 veces) que los de la LF nativa (Tomita *et al.*, 1991; Bellamy *et al.*, 1992b; Dionysius & Milne, 1997; Gifford *et al.*, 2005), lo que quizás podría explicarse por su menor tamaño que presentaría menor impedimento estérico en la superficie microbiana y podría actuar más fácilmente sobre la membrana interna. Además se considera que la LFC bovina exhibe mayor potencia bactericida que la humana, murina y caprina, quizás por su mayor proporción de residuos básicos (Vorland *et al.*, 1998; Ueta *et al.*, 2001).

Como ya se ha indicado, la LFC carece de la región y capacidad quelante de hierro de la LF nativa, pero se considera que su mecanismo de acción microbicida es probablemente similar al de la LF y otros péptidos catiónicos. De este modo la LFC, al igual que la LF, interaccionaría electrostáticamente con moléculas cargadas negativamente de la membrana y pared microbianas causando su desestabilización, desestructuración, despolarización, y alterando su permeabilidad (Yamauchi *et al.*, 1993; Ulvatne *et al.*, 2001; Hunter *et al.*, 2005; Flores-Villaseñor *et al.*, 2010), y podría también interaccionar con porinas de membrana como la OmpC y PhoE (Sallmann *et al.*, 1999). Además se ha observado que la LFC es capaz de inducir daños a nivel citoplasmático y se ha llegado a localizar en el interior de microorganismos como *E. coli* y *S. aureus*, lo que indica que atravesar la pared y membrana bacterianas y ejercer su actividad a nivel intracitoplasmático (Haukland *et al.*, 2001; Van der Kraan *et al.*, 2005b), donde podría interaccionar con gran cantidad de moléculas polianiónicas como ácidos nucleicos y proteínas, alterando la biosíntesis de macromoléculas (Ulvatne *et al.*, 2004). Su eficacia bactericida alcanza el máximo en 1 hora (Ellison, 1994). Se ha demostrado para una gran variedad de bacterias gram positivas como *B. subtilis*, *C. perfringens*, *C. diptheriae*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. bovis* y *S. mutans*, y de gram negativas como *C. jejuni*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P.*

aeruginosa, *S. enteritidis* y *Y. enterocolitica*, así como frente a levaduras como *Candida* (Tomita *et al.*, 1991; Bellamy *et al.*, 1992b; Jones *et al.*, 1994), presentando sin embargo gran resistencia *E. faecalis*, *B. bifidum*, *Proteus* spp., *P. cepacia*, *P. fluorescens* y *Serratia* spp. Junto con esta actividad microbiciida, se considera que la LFC comparte muchas otras actividades biológicas con la LF nativa (Wakabayashi *et al.*, 2003b; Haug *et al.*, 2007), como son:

- Actividad antiparasitaria frente a protozoos (Turchany *et al.*, 1995; Isamida *et al.*, 1998; León-Sicairos *et al.*, 2006).
- Actividad antioxidante (Wakabayashi *et al.*, 1999).
- Actividad inmunomoduladora (Mattsby-Baltzer *et al.*, 1996; Shinoda *et al.*, 1996; Miyauchi *et al.*, 1998; Britigan *et al.*, 2001; Ueta *et al.*, 2001).
- Actividad antitumoral (Roy *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002), probablemente mediada por la apoptosis inducida por MAP quinasas (Sakai *et al.*, 2005) y/o por la generación de ROS sobre células tumorales (Yoo *et al.*, 1997).
- Actividad mitogénica e inductora del factor de crecimiento nervioso (NGF) en fibroblastos (Shinoda *et al.*, 1993).
- Actividad inhibidora de la coagulación y de la agregación plaquetaria (Leveugle *et al.*, 1993).
- Actividad antihipertensora (Ruiz-Giménez *et al.*, 2010), probablemente por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE).

Actualmente, debido a todas sus posibles aplicaciones, se está estudiando la producción a gran escala de LFC y de otros péptidos catiónicos derivados de la LF, mediante la digestión con pepsina y purificación mediante resinas de intercambio iónico. Este sistema permite obtener 14 g de LFC por cada kg de lactoferrina, habiéndose observado que la cantidad de LFC obtenida no se ve afectada por el grado de saturación de hierro de la LF, que sí afecta a otros péptidos; así, un bajo grado de saturación favorece la obtención de péptidos de pequeño tamaño molecular, mientras que un alto grado de saturación favorece la obtención de péptidos de mayor tamaño (Chan & Li-Chan, 2007).

De forma similar a la digestión de la LF con pepsina para la obtención de LFC, se ha investigado también la digestión con quimosina. Se obtienen así cuatro péptidos, uno de ellos idéntico a la LFC, otro igual a la LFC pero con una alanina C-terminal, otro con una alanil-leucina C-terminal y el cuarto es un heterodímero con un puente disulfuro. Todos ellos presentan actividad bactericida frente a Gram positivos y Gram negativos (Hoek *et al.*, 1997). Se ha investigado también el hidrolizado de LF resultante tras su tratamiento térmico a 120 °C durante 15 minutos a pH ácido (2.0), y se ha visto que presenta mayor potencia bactericida en condiciones *in vitro* frente a *E. coli* O111 que la molécula nativa (Saito *et al.*, 1991).

5.6.2- Modificaciones químicas de la lactoferrina.

Se ha observado que la amidación química de la lactoferrina incrementa el efecto bactericida de la molécula, probablemente al incrementar la carga neta positiva de ésta. La LF amidada (AMILF) presenta un patrón electroforético en el que se aprecia una muy ligera disminución del peso molecular de la LF nativa, apareciendo además una banda de alto peso molecular (superior a 200 kDa) que podría resultar de la interacción y polimerización entre moléculas amidadas. Esta AMILF presenta mayor actividad bactericida que la LF nativa frente a bacterias gram negativas como *E. coli*, *P. fluorescens*, *P. fragi* y *S. typhimurium*, y gram positivas como *B. subtilis*, *E. faecalis* y *L. monocytogenes*, pero no frente a otros microorganismos como *Penicillium candidum* y *Saccharomyces cerevisiae* (Pan *et al.*, 2007a,b).

Sin embargo otras modificaciones químicas de la LF, como por ejemplo la acilación, disminuyen la eficacia antimicrobiana de la molécula nativa tanto frente a bacterias como virus, lo que podría deberse al incremento en la carga neta negativa de la LF (Pan *et al.*, 2007a).

5.6.3- Lactoferrina activada.

La lactoferrina activada (ALF), también llamada lactoferrina estabilizada o inmovilizada, es una preparación protegida por una patente (Naidu, 2001). Su forma comercial se denomina “activin™” y su composición incluye LF bovina con el extremo N-terminal modificado (con un polisacárido rico en galactosa o un carrageno unido), bLF libre (sin modificar), EDTA, cloruro sódico, ácido cítrico y bicarbonato sódico. Se considera que es varias veces más potente que la LF nativa y que presenta actividad antimicrobiana, impidiendo la colonización y adhesión microbianas, inhibiendo el crecimiento y multiplicación, y neutralizando endotoxinas, no afectando sin embargo a la flora comensal (Naidu, 2002; Naidu & Nimmagudda, 2003; Naidu *et al.*, 2003). Su uso está aprobado desde el año 2001 por la USDA/FDA en carne fresca y canales, y se emplea en forma de spray en concentración entre un 1 y 4% aplicado electrostáticamente. La fabrican los laboratorios DMV International Nutritionals, y es empleada por la empresa National Beef Company (USA) formando parte del procesado y lavado de las canales, que incluye además distintos pasos de lavado en agua fría y caliente, y en ácido láctico. Se considera que aplicada de esta forma actúa como un potente antimicrobiano que previene la proliferación bacteriana y la adhesión a la carne, siendo eficaz frente a más de 30 especies bacterianas de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brochotrix*, *Campylobacter*, *Deinobacter*, *Deinococcus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Methylobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Yersinia* (Naidu, 2001; Naidu, 2002), y frente a

Candida spp. (Naidu et al., 2004a,b). La ALF está así reconocida como GRAS en Estados Unidos por la FDA siempre que sus niveles en carne no superen los 65.2 mg/kg (FDA/CFSAN, 2001). La patente de esta LF activada indica otras posibles aplicaciones además de la conservación de carne y canales, que incluyen su uso para la higiene y salud bucal, cuidado y desinfección de heridas, y su uso como nutracéutico (Naidu, 2001; Naidu & Nimmagudda, 2003).

5.6.4- Otros derivados.

Se están investigando diversos péptidos catiónicos anfipáticos derivados de la LF y obtenidos por síntesis química, como:

- La lactoferrampina (LFamp), un péptido catiónico obtenido en laboratorio, derivado de la bLF y constituido por los residuos 268 a 284 de ésta. Al igual que para la LFC, se considera que debido a su pequeño tamaño tiene mayor potencia antimicrobiana que la LF nativa, y se ha visto que en pocos minutos altera la integridad de la membrana y es internalizada por los microorganismos (Van der Kraan *et al.*, 2005b; Flores-Villaseñor *et al.*, 2010). Hay estudios que demuestran su eficacia *in vitro* frente a microorganismos como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* y *C. albicans*, pero sin embargo no resulta eficaz frente a *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis* (Van der Kraan *et al.*, 2004, 2005a,b).
- El péptido de síntesis resultante de la unión de la LFC y LFamp, que presenta una mayor eficacia bactericida *in vitro* que los péptidos individuales frente a bacterias gram positivas y gram negativas, como *Streptococcus* y *Pseudomonas* (Bolscher *et al.*, 2009).
- El péptido derivado de la bLF compuesto por los residuos 1 a 133 (bLFN), es decir por el lóbulo N, y el péptido compuesto por los residuos 1 a 344 (bLFA), que incluye el lóbulo N y la región interlobular, que presentan mayor eficacia en condiciones *in vitro* frente a *S. aureus* (Bai *et al.*, 2010).
- Diversos péptidos derivados de la LF humana y bovina, como el hLF18-31, hLF20-38, bLF17-30 y bLF19-37, se están desarrollando con vistas a su aplicación como antimicrobianos para la higiene bucal, pues parecen ser más eficaces que la molécula nativa frente a microorganismos como *S. aureus*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Groenink *et al.*, 1999).

- Lipopéptidos derivados de la hLF constiuidos por los residuos 21 a 31, a los que se han añadido cadenas aciladas de entre 6 y 8 carbonos, que podrían tener mayor eficacia antimicrobiana (Majerle *et al.*, 2003).
- El péptido hLF1-11, un derivado de la LF humana que contiene 11 aminoácidos del extremo N terminal de la molécula, y es rico en arginina y altamente catiónico (Chapple *et al.*, 1998). Es capaz de ejercer un efecto bactericida más potente que la LF nativa en condiciones *in vitro* (Nibbering *et al.*, 2001), siendo capaz de atravesar la membrana plasmática y actuar a nivel citoplasmático (Huo *et al.*, 2011). Se ha demostrado su actividad frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Acinetobacter baumannii* y *Candida* spp. (Lupetti *et al.*, 2003; Dijkshoorn *et al.*, 2004; Stallmann *et al.*, 2004; Faber *et al.*, 2005) y se está estudiando su posible uso en pacientes inmunodeprimidos. No obstante, podría tener efectos adversos como elevación de las transaminasas (Van der Velden *et al.*, 2009).
- El undecapéptido derivado de la LFC bovina formado por los residuos 17 a 27, así como sus modificaciones químicas alterando algunos de sus residuos o amidándolo. En general parece ser que los péptidos con una carga neta superior o igual a +4 y que contienen 3 ó 4 residuos de triptófano ejercen una mayor actividad bactericida (Strøm *et al.*, 2002).
- El undecapéptido correspondiente a los residuos 21 a 31 de la hLF y su forma modificada, en la que la isoleucina de la posición 27 es sustituida por una metionina y se ha incorporado a su extremo N-terminal una cadena lauril acilada. Ambos presentan actividad bactericida frente a *Salmonella enterica*, pero la forma modificada tiene mayor potencia bactericida y mayor actividad neutralizante de endotoxina o capacidad de interacción con el LPS (Andrä *et al.*, 2005).
- Los péptidos formados por los residuos 20 a 35 y 24 a 35 del N-lóbulo de la hLF, que ejercen un potente efecto bactericida frente a *E. coli* O111 (Odell *et al.*, 1996).
- El tetrapéptido derivado de la LF formado por los residuos 39 a 42 (Lys-Arg-Asp-Ser: KRDS) y su forma modificada con cadenas butoxi- y butil-carbonilo (PEP), que presentan actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de bacterias gram positivas y gram negativas como *B. thuringiensis*, *S. aureus*, *Alcaligenes* sp., *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *S. typhi* y *K. pneumoniae*, así como frente a levaduras como *K. fragilis* y *S. cerevisiae*, y en menor medida frente a mohos filamentosos como *A. flavus* y *A. niger*. Es más eficaz la forma modificada (PEP) que la nativa (Ramesh *et al.*, 2004).

6- LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

6.1- Generalidades.

La utilidad de los tratamientos por altas presiones en el campo de los alimentos fue ya señalada por Hite en 1899 para la conservación de leche y después en 1914 para la conservación de zumos y carne, pero debido a su alto coste y dificultades técnicas no ha adquirido especial importancia y aplicación comercial hasta la década de los 80. En el campo de los materiales inorgánicos se venía empleando en procesos industriales, en los que se combinan presiones a partir de 100 MPa con temperaturas del orden de 1000 °C, para la obtención de cerámicas, aleaciones de metales y la creación de materiales sintéticos (Hoover *et al.*, 1989).

El procesado con altas presiones (HPP – high pressure processing) también se denomina procesado con ultra-alta presión, o con altas presiones hidrostáticas (HHP – high hydrostatic pressure) en caso de que el fluido hidráulico transmisor de la presión sea agua (que suele usarse habitualmente debido a su baja compresibilidad). Este procesado con altas presiones implica, en la industria alimentaria, someter a los productos una vez inmersos en un líquido (generalmente agua, como ya se ha indicado) a elevadas presiones (habitualmente entre 100 y 600 MPa, pero se pueden alcanzar hasta 1000 MPa) con o sin aplicación de calor. Esto permite alcanzar la inactivación de los microorganismos y/o la alteración de las características de los alimentos según el producto a elaborar.

La presión se define como la fuerza ejercida por un líquido o un gas por unidad de superficie, y su unidad de medida en el Sistema Internacional es el Pascal (Pa = N/m²). La tecnología de las altas presiones se basa en dos principios fundamentales (Cheftel, 1991; Earnshaw, 1996), que son:

- La ley de Pascal o ley de la transmisión isostática de la presión, por la que “una presión externa aplicada a un fluido confinado se transmite de forma instantánea y uniforme en todas las direcciones”. Con esta tecnología la presión se transmite de forma instantánea y uniforme a través de toda la masa del producto independiente de su volumen, al estar inmerso en un fluido transmisor.
- El principio de moderación de Le Chatelier. Este principio fue enunciado en 1884, e indica que los fenómenos que van acompañados de una disminución de volumen son favorecidos por un aumento de presión, y viceversa. Según este principio, la aplicación de altas presiones desplaza el equilibrio de un proceso hacia el estado que ocupa menos volumen. Ello implica que procesos como la formación de macromoléculas proteicas, la ruptura de interacciones hidrofóbicas y de pares de iones, y la formación de

puentes de hidrógeno se verían favorecidos por la presión pues van acompañados de una restricción de volumen, aunque hay algunos estudios que indican que los puentes de hidrógeno prácticamente no se ven afectados por la presión (Gross & Jaenicke, 1994; Mozhaev *et al.*, 1994).

Para el procesado con altas presiones, generalmente el producto es envasado en un contenedor o recipiente flexible. Luego se introduce en una cámara o vasija de alta presión rellena con un fluido hidráulico transmisor de la presión, que normalmente suele ser agua, aunque también se usan otros fluidos como aceite de silicona, soluciones de benzoato sódico, propilenglicol y etanol. A través de una bomba la cámara es presurizada, y la presión es transmitida al producto a través del envase. Suele ser un proceso corto (lo más habitual a nivel comercial son 3-5 minutos), la transmisión de presión es uniforme (tiene lugar en todas las direcciones en todo el producto) y por tanto el producto mantiene su forma. Como en muchos casos no es necesaria la aplicación de altas temperaturas, las características sensoriales y nutricionales del producto apenas se alteran (aunque como luego veremos esto depende del producto y tratamiento, y se pueden llegar a inducir cambios indeseados o cambios deseados y buscados). Por otro lado hay que tener en cuenta que durante la presurización se produce un cierto aumento de la temperatura del producto, como consecuencia del calentamiento adiabático, que suele ser de unos 3 °C por cada 100 MPa, aunque esto va a depender de la temperatura inicial del producto y del fluido, y de la composición del alimento. Por ejemplo, cuanto mayor sea el contenido en grasa del producto mayor será la subida de temperatura, llegando hasta 8 ó 9 °C por cada 100 MPa (Rasanayagam *et al.*, 2003).

6.2- Equipos de altas presiones.

Básicamente, un equipo de altas presiones se compone de una cámara o vasija resistente a la presión, un sistema de bombeo para la compresión del fluido hidráulico o de presurización, una unidad de control de la presión aplicada y un dispositivo para regular la temperatura. La generación de la presión se puede conseguir mediante dos métodos (Trespalacios, 2007):

- Compresión directa (usada principalmente en equipos discontinuos). La presión se genera directamente en el interior de la cámara por la compresión del fluido de presurización en el que va inmerso el producto. Tiene la ventaja de alcanzar rápidamente presiones elevadas pero puede presentar problemas de estanqueidad, y su uso se limita a cámaras de pequeño volumen.
- Compresión indirecta (usada principalmente en equipos semicontínuos). El fluido de presurización es enviado hacia la cámara por una bomba o

intensificador, y este fluido a su vez empuja a un pistón que aplica la presión sobre el producto a presurizar, que debe ser un líquido. Es el sistema más empleado para grandes volúmenes, a nivel industrial.

Además, según su funcionamiento, los equipos pueden clasificarse en (Daoudi, 2004):

- Equipos de tipo discontinuo (ver Figura 4). Se emplean para productos líquidos o sólidos, pero siempre envasados. El sistema de compresión suele ser de tipo directo, y constan de un cilindro o vasija de acero inoxidable que contiene en su interior el líquido de compresión. Este líquido es impulsado desde un depósito hasta esta cámara, en la que el producto envasado es introducido previamente. Mediante un pistón y una bomba el fluido de compresión se va inyectando en la cámara hasta alcanzar la presión deseada. Así por ejemplo, una bomba de baja presión (de 75 kW) puede subir la presión de un recipiente de 50 litros a 680 MPa en unos 3-4 minutos. La cantidad de fluido a inyectar en la cámara es algo superior a su capacidad inicial, para así compensar la presión y el ligero aumento de volumen de la cámara. Por ejemplo, a un recipiente de 100 litros habría que bombearle 15 litros adicionales para alcanzar unos 680 MPa. Finalmente, la descompresión se logra abriendo la válvula de presión hasta igualar la presión atmosférica. El cilindro interior y todas las partes expuestas al fluido de compresión (que suele ser agua) deben ser de acero inoxidable para evitar la corrosión, y aquellas partes de acero de alta fuerza de tensión (acero no inoxidable) deben estar recubiertas de un lubricante alimentario autorizado, agentes anticorrosión y compuestos antimicrobianos.
- Equipos de tipo semicontinuo (ver Figura 5). Se emplean para productos que pueden ser bombeados, es decir, líquidos. La compresión es de tipo directo, y es generada por un pistón que es empujado por el fluido de compresión, y es este pistón el que presuriza el producto. Se emplea para líquidos, y hay que tener en cuenta que éstos se encuentran en contacto directo con las paredes de la cámara y con el pistón de compresión, que por tanto deben estar fabricados con un material no susceptible a la corrosión y adecuado para entrar en contacto con los alimentos. Finalizada la presurización, el producto es evacuado de la cámara por una válvula aséptica de alta presión.

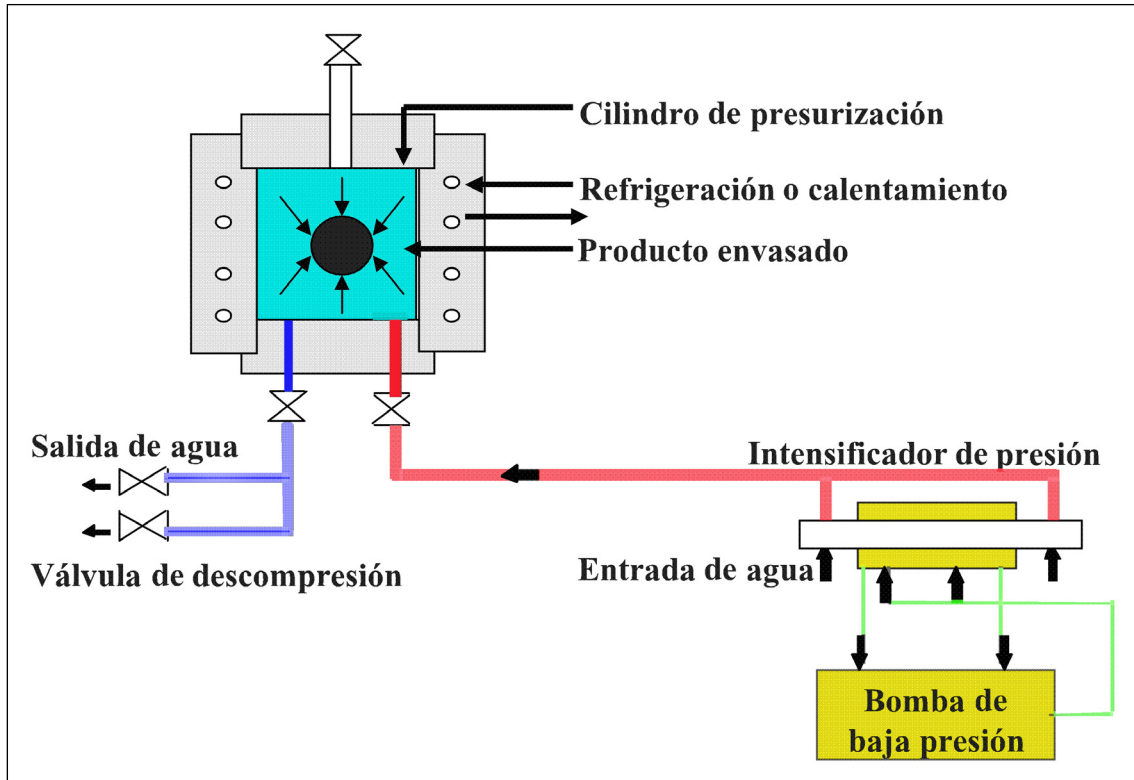


Figura 4. Sistema discontinuo para la aplicación de altas presiones (Daoudi, 2004).

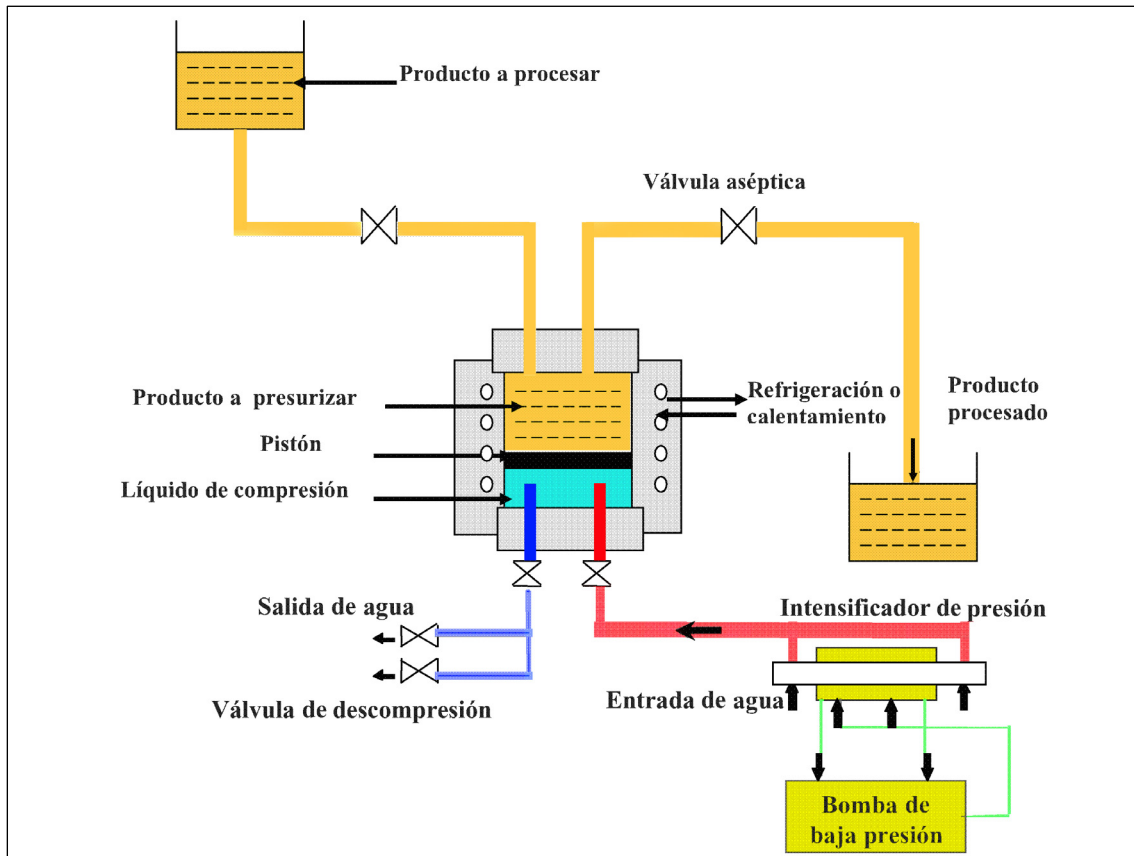


Figura 5. Sistema semicontinuo para la aplicación de altas presiones (Daoudi, 2004).

Los equipos de laboratorio para aplicar altas presiones constan de cámaras o recipientes de presión de volumen reducido, de entre 0.1 y 3 litros, mientras que los equipos de planta piloto suelen diseñarse con capacidades de entre 5 y 25 litros, y los industriales de varios cientos de litros. Por ejemplo, Avure Technologies (Kent, WA, USA) comercializa equipos industriales de 215 litros de capacidad, que permiten el procesamiento de 5 millones de kg de productos al año. Esta misma compañía comercializa equipos de tipo semicontinuo para el procesamiento de líquidos (como zumos), que pueden alcanzar 680 MPa de presión. NC Hyperbaric (Burgos) comercializa equipos industriales de tipo discontinuo con distintas capacidades, desde 55 hasta 420 litros, capaces de alcanzar presiones de hasta 600 MPa, y con posibilidad de controlar la temperatura entre 5 y 120 °C, según el modelo. Los equipos de investigación presentan menor capacidad pero algunos pueden alcanzar presiones de hasta 1000 MPa.

6.3- Efecto sobre los microorganismos.

Existe un gran número de estudios que explican cómo se produce la inactivación de las formas vegetativas microbianas por las altas presiones. Estos mecanismos de inactivación inducidos por la presión incluyen (Hoover *et al.*, 1989; Kato & Hayashi, 1999; Mackey & Mañas, 2008; Van Doorne, 2008):

- Alteraciones de la membrana celular, como pérdida de fluidez y solidificación de lípidos y fosfolípidos de membrana.
- Alteraciones de la morfología celular, con rotura de membranas y pérdida de la integridad celular.
- Desnaturalización de proteínas y enzimas.
- Daño en los mecanismos de replicación y transcripción del material genético, y en la síntesis proteica.

Se considera que el primer sitio de actuación que resulta dañado por la presión son las membranas celulares. Esto se refiere no sólo a la membrana plasmática sino también a otras membranas como pueden ser la membrana nuclear, de organelas, y de vesículas o vacuolas, mientras que la pared celular es más resistente. Las alteraciones de la membrana inducidas por la presión incluyen la disminución de la fluidez de lípidos y fosfolípidos de membrana, llegando a su solidificación y fragmentación de las bicapas lipídicas, desnaturalización de enzimas asociadas, desequilibrio osmótico, pérdida de integridad celular, y pérdida de ARN y de proteínas (Morita, 1975; Wouters *et al.*, 1998; Ulmer *et al.*, 2000; Casadei *et al.*, 2002). Por otro lado, los ácidos nucleicos son bastante estables a la presión, aunque sí pueden resultar desnaturalizadas enzimas implicadas en la replicación y transcripción del ADN. Además, en algunos casos se ha observado la condensación del material

genético nuclear por la presión (Mackey *et al.*, 1994; Wouters *et al.*, 1998) o bien debido a la presión el ADN podría entrar en contacto con endonucleasas y resultar así dañado (Chilton *et al.*, 1997).

En general se asume que cuanto mayor sea la presión, el tiempo de mantenimiento y la temperatura, mayor será el efecto sobre los microorganismos y más alterado resultará el producto en sus cualidades organolépticas y nutricionales. Sin embargo esto tiene un límite, por encima del cual no se incrementa necesariamente el efecto letal de las altas presiones sobre los microorganismos. Así, el efecto de la presión suele ser mayor en los primeros 20 minutos de aplicación, y a partir de este momento su efectividad es cada vez menor. Incluso se ha observado que la destrucción bacteriana conseguida mediante tratamientos cíclicos con alta presión es superior a la conseguida mediante un proceso continuo de una sola etapa (Hayakawa *et al.*, 1994; Ponce *et al.*, 1999b; Huang *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2007; Bari *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2009). Otros factores que influyen en la efectividad del tratamiento con altas presiones son la temperatura, el pH y la actividad de agua. Se considera que las formas vegetativas resisten mejor las altas presiones a temperaturas comprendidas entre 20 y 35 °C, mientras que por encima de 35 °C aumenta la susceptibilidad microbiana quizás como consecuencia de la transición de fase de los lípidos de membrana (Ludwig *et al.*, 1992; Kalchayanand *et al.*, 1998a,b). De este modo, mediante combinaciones de presión y temperatura, se pueden llegar a alcanzar inactivaciones microbianas importantes usando tiempos y presiones más bajos que los requeridos a temperatura ambiente (Smelt, 1998). Se ha visto que *L. monocytogenes* no resulta inactivada en leche aplicando presiones de 200 MPa cuando la temperatura es inferior a 45 °C, pero a 55 °C el tratamiento con 200 MPa durante 15 minutos logra reducciones de hasta 6 unidades logarítmicas (Simpson & Gilmour, 1997b). Por otro lado, los valores ácidos de pH aumentan la sensibilidad de los microorganismos a la presión (Smelt, 1998), mientras que valores bajos de actividad de agua tienen un efecto controvertido ya que por sí mismos pueden inhibir el crecimiento microbiano, pero en el tratamiento combinado con altas presiones aumentan la resistencia a la presión de los microorganismos (Ordoñez *et al.*, 2004). Además, se considera que medios complejos y ricos en nutrientes incrementan también la resistencia microbiana a las altas presiones (Hoover *et al.*, 1989).

6.3.1- Efecto sobre bacterias.

Como ya se ha indicado, la resistencia de los microorganismos a la presión depende de muy diversos factores (Patterson, 2005; Considine *et al.*, 2008; Van Doorne, 2008), tales como el tipo de microorganismo (género, especie y cepa), fase de crecimiento, temperatura, presión, tiempo de tratamiento, pH y composición físico-

química del medio (Metrick *et al.*, 1989; Shigehisa *et al.*, 1991; Styles *et al.*, 1991; Carlez *et al.*, 1992; Carlez, 1994; Mackey *et al.*, 1995; Patterson *et al.*, 1995; Hauben *et al.*, 1997; Patterson *et al.*, 1997; Kalchayanand *et al.*, 1998a,b; Alpas *et al.*, 1999; Benito *et al.*, 1999; Alpas *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006; Malinowska-Pańczyk *et al.*, 2008), así como la presencia de aditivos alimentarios (como albúmina bovina, aceite de oliva, grasas, glucosa y sacarosa) y de ciertos cationes como calcio, magnesio, manganeso y hierro (Simpson & Gilmour, 1997a; Hauben *et al.*, 1998; Gervilla *et al.*, 2000; Van Opstal *et al.*, 2003).

Las formas vegetativas bacterianas son mucho más sensibles a la presión que sus formas de resistencia o esporas. En cuanto a la susceptibilidad o tolerancia a las altas presiones para las células vegetativas bacterianas, se ha observado en líneas generales que:

- Las bacterias en la fase exponencial de crecimiento son más sensibles que en la fase de latencia (Mackey *et al.*, 1995).
- Existe una correlación positiva entre resistencia a la temperatura y a la presión (Trespacios, 2007).
- Las bacterias gram positivas son más resistentes que las gram negativas (Cheftel, 1995; Earnshaw, 1995; Mackey *et al.*, 1995; Gervilla *et al.*, 2000).
- Los cocos son más resistentes que los bacilos (Ludwig & Schreck, 1997).

Sin embargo, existen excepciones. Así por ejemplo hay cepas de *E. coli* O157:H7 que en contra de lo que cabría esperar, al ser gram negativa y bacilar, son altamente resistentes a la presión, así como a la temperatura, ácidos y estrés oxidativo y osmótico (Benito *et al.*, 1999).

Las esporas bacterianas son formas de resistencia bacteriana, que gozan de una gran tolerancia frente a diversas condiciones y tratamientos físico-químicos, así como frente a la presión. Algunos de los factores implicados en la resistencia de las esporas bacterianas a las altas presiones son la envoltura de peptidoglicano, el bajo contenido en humedad, los altos niveles de ciertos ácidos como el dipicolínico, y el alto contenido en proteínas pequeñas ácido-solubles (Akhtar *et al.*, 2009). Estos factores hacen que las esporas puedan sobrevivir incluso a tratamientos de varias horas con presiones entre 800 y 1000 MPa (Smelt, 1998; Sale *et al.*, 1970). *C. botulinum* no proteolítico tipo B es el patógeno esporulado más resistente hasta la fecha (Reddy *et al.*, 2001). Además de su resistencia, hay que tener en cuenta que la inactivación de las esporas por la presión tiene lugar en dos fases. Primero tiene que producirse o inducirse la germinación de la espora, y después lograr la inactivación de la forma vegetativa germinada (Clouston & Wills, 1969; Gould & Sale, 1970). Ambas fases pueden verse favorecidas por el calentamiento (Sale *et al.*, 1970; Raso *et al.*, 1998; Oh & Moon, 2003).

6.3.2- Efecto sobre mohos y levaduras.

Tanto los mohos como las levaduras son, en general, microorganismos muy sensibles a las altas presiones. Presiones superiores a 100 MPa ya inducen alteraciones en la membrana celular, complejo de Golgi y membrana nuclear, rompen vacuolas y alteran la distribución mitocondrial (Shimada *et al.*, 1993; Fernandes *et al.*, 2001). La inactivación se alcanza, habitualmente, con presiones entre 200 y 400 MPa a temperatura ambiente (Cheftel, 1995), y presiones superiores a 500 MPa ya llegan a inducir la rotura de la pared celular. Sin embargo, en algunos casos se ha detectado cierta resistencia a la inactivación con altas presiones, como por ejemplo en el caso de las ascosporas de *Byssoschlamys* y *Talaromyces* que requieren tratamientos de más de 600 MPa a 60 °C (Britz *et al.*, 1996; Voldrich *et al.*, 2004).

6.3.3- Efecto sobre virus.

Bajo la denominación de virus se engloba un grupo muy heterogéneo de microorganismos, tanto en su estructura y secuencia proteica como en cuanto a su composición en ácidos nucleicos, de modo que su resistencia y respuesta a la presión varía considerablemente según el tipo, grupo y cepa. Entre los virus que presentan mayor susceptibilidad a las altas presiones se encuentran los virus con ADN y cápsula proteica (como por ejemplo los bacteriófagos). Así, se ha visto que su carga resulta considerablemente disminuida a presiones entre 300 y 400 MPa (Brauch *et al.*, 1990). Para los calicivirus y virus de la hepatitis A han resultado altamente eficaces tratamientos con altas presiones entre 200 y 400 MPa a temperatura ambiente durante menos de 5 minutos, alcanzándose reducciones de más de 5 unidades logarítmicas en condiciones *in vitro* (es decir, en cultivos celulares). Sin embargo, esta eficacia resulta notablemente disminuida al aplicar el tratamiento en alimentos, de tal modo que las reducciones fueron inferiores a 3 unidades logarítmicas (Kingsley *et al.*, 2002; Calci *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Kingsley *et al.*, 2005; Grove *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008). Presiones más elevadas, entre 400 y 500 MPa, han resultado eficaces frente a influenzavirus (Gaspar *et al.*, 2002), el virus de la estomatitis vesicular (Silva *et al.*, 1992) y calicivirus MNC-1 (Kingsley *et al.*, 2007), pero igualmente su eficacia es menor al aplicar el tratamiento en alimentos. Tratamientos más intensos, de 500 a 600 MPa, son necesarios para la inactivación de virus como el del HIV (Otake *et al.*, 1997), coxsackivirus A9 (Kingsley *et al.*, 2004) y levivirus (Guan *et al.*, 2006), pero de igual manera la resistencia de los virus a la presión se ve incrementada en alimentos (Sharma *et al.*, 2008). Finalmente, algunos virus como los coxsackivirus B5, aichivirus y poliovirus presentan una gran resistencia a presiones de incluso 600 MPa (Wilkinson *et al.*, 2001; Kingsley *et al.*, 2004).

Algunos autores han indicado que los virus inactivados por altas presiones conservan sus propiedades inmunogénicas, lo que posibilitaría la obtención de vacunas. No se conoce bien el mecanismo por el que esto ocurre, pero quizás podría deberse a cambios conformacionales o estructurales inducidos por la presión, que impiden la adhesión del virus a la superficie de la célula hospedadora (Nakagami *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1992; Leimkuhler *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2000). Por otro lado hay que tener en cuenta que algunos autores han alertado de la posibilidad del desarrollo vírico de resistencias y adaptaciones frente a las altas presiones (Smiddy *et al.*, 2006).

6.3.4- Efecto sobre priones.

Los priones son partículas infectivas acelulares, no inmunógenas, de naturaleza proteica, y carentes de ácidos nucleicos. Fueron descubiertos por Prusiner (1982) y hoy se sabe que son responsables de las encefalopatías espongiformes transmisibles, como el kuru, el scrapie o tembladera o prurito lumbar ovino, la encefalopatía espongiforme bovina, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y su nueva variante, el insomnio familiar fatal, la enfermedad de Gerstmann-Straüssler-Scheinker, el síndrome del agotamiento crónico del alce, y otras encefalopatías espongiformes como la felina y la del visón. Un prión es una glicoproteína de unos 30 kDa de peso molecular, con una estructura terciaria especialmente rica en β -láminas que es lo que le confiere su insolubilidad y alta estabilidad. Su secuencia aminoacídica es idéntica a la de cierta proteína (PrP^{N}) que aparece de forma normal en el organismo, siendo su estructura terciaria la que está alterada (con gran proporción de β -láminas frente a α -hélices). Esta proteína anómala es además capaz de inducir el cambio de conformación y polimerización de la proteína normal, por lo que se considera a los priones como partículas “auto-replicables” y totalmente independientes de la replicación mediada por ácidos nucleicos. Son partículas extremadamente resistentes a muy diversos factores, como pH, enzimas como proteasas y nucleasas, radiaciones ultravioletas e ionizantes, temperatura, quelantes, desinfectantes, alcoholes y diversos agentes químicos. Para su inactivación se requieren tratamientos de 134 °C durante al menos 18 minutos a 3 atmósferas, y tratamientos de incineración a 850 °C durante al menos 2 segundos para su destrucción. Debido a esta resistencia resulta especialmente interesante el uso combinado de la temperatura y las altas presiones como alternativa para la inactivación de priones en alimentos. Hay estudios que indican que tratamientos con presiones de entre 690 y 1200 MPa y temperaturas de entre 121 y 137 °C podrían ser capaces de inactivar partículas priónicas en carne (Brown *et al.*, 2003; Cardone *et al.*, 2006).

6.4- Efecto sobre compuestos químicos y componentes de los alimentos.

Las altas presiones no sólo actúan sobre los microorganismos presentes en los alimentos, sino también sobre sus componentes químicos. Las reacciones químicas se ven también afectadas, y según el principio de Le Chatelier se ven favorecidas aquellas que conducen a una disminución de volumen. De este modo las altas presiones afectan principalmente a las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas y, en menor grado a los puentes de hidrógeno, no afectando a los enlaces covalentes (Cheftel & Culioli, 1997).

6.4.1- Efecto sobre el agua.

La presión afecta a muchas propiedades físicas y químicas del agua (Cheftel, 1992), como son:

- El volumen. La presión disminuye el volumen del agua entre un 4 y 15% para 100 y 600 MPa, respectivamente. Hay que tener en cuenta que los alimentos con alta humedad y poco aire van a reaccionar a las altas presiones de forma similar a la del agua, disminuyendo su volumen y aumentando por tanto su densidad, y como consecuencia los coeficientes de difusión de los solutos disminuirán. Además no sólo se produce una disminución de volumen del agua, sino una compresión adiabática que promueve el incremento de temperatura en unos 2-3 °C por cada 100 MPa aplicados, aunque dependerá de la temperatura inicial del agua y de la velocidad de compresión.
- El pH. La presión induce la disociación reversible de las moléculas de agua, y por un fenómeno de electrostricción puede verse disminuido su pH, pasando de 7.0 a 6.27 al aumentar la presión de 0.1 a 100 MPa.
- Las fases de transición del agua. Presiones hasta 210 MPa disminuyen el punto de congelación del agua, alcanzándose el punto triple a 210 MPa y -22 °C, condiciones en las que aparecen al mismo tiempo agua en estado líquido y cristales de hielo tipo I y III. Sin embargo, a partir de 210 MPa la presión aumenta el punto de congelación y se forman cristales de hielo de tipo II a VIII (Kalichevsky *et al.*, 1995). Esto hace que para 70 MPa el punto de congelación se alcance a -5 °C y para 200 MPa a -20 °C, mientras que para 400 MPa se alcanza a -12 °C, para 600 MPa a 0 °C, para 800 MPa a 10 °C, para 1000 MPa a 22 °C y para 2000 MPa a 72 °C. Los cristales de hielo formados bajo presión (tipos II a VIII) son de menor tamaño que los formados por congelación convencional (tipo I), lo que aplicado por ejemplo a carne disminuye el daño de tejidos y células por el hielo, hay menor

pérdida de agua a la descongelación y la textura es mejor y más uniforme (Deuchi & Hayashi, 1992).

6.4.2- Efecto sobre hidratos de carbono.

En general, los azúcares simples y los compuestos sencillos de bajo peso molecular no se ven afectados por la presión (Cheftel, 1991,1992), mientras que los polisacáridos y compuestos más complejos pueden sufrir la disociación de sus cadenas, y resultar alterada la transición sol-gel y sus propiedades gelificantes. Así se ha observado que el almidón, por efecto de la presión, gelatiniza a temperaturas más bajas (Hayashi & Hayashida, 1989) y que los geles obtenidos por presión son distintos de los obtenidos por efecto de la temperatura (Moshayev *et al.*, 1994). Otro aspecto importante es que presiones entre 50 y 200 MPa son capaces de inhibir las reacciones de condensación de Maillard (pardeamiento no enzimático), por lo que no se produce el desarrollo de sabor y color típico de esta reacción (Sangronis *et al.*, 1997).

6.4.3- Efecto sobre lípidos.

La presión va a afectar principalmente a los cambios de fase, incrementando de forma reversible el punto de fusión en unos 10-15 °C por cada 100 MPa (Buchheim & El Nour, 1992). Esto hace que los lípidos que son líquidos a temperatura ambiente puedan cristalizar por efecto de la presión, y los cristales formados son densos y muy estables. Además, según algunos autores la presión dificultaría el desarrollo de la fase inicial de la oxidación lipídica, inhibiendo así en cierta forma el enranciamiento de las grasas (Rovere, 1995), pero otros autores indican que la presión podría favorecer este fenómeno (Beltrán *et al.*, 2003). Por ejemplo en alimentos con alto contenido en proteínas, como la carne y el pescado, se ha visto que las altas presiones favorecen la oxidación lipídica. Esto quizás podría deberse a la desnaturalización proteica inducida por la presión, que a su vez causa la liberación de iones metálicos que estaban ligados a proteínas y enzimas, los cuales a su vez actuarían como catalizadores de la oxidación de las grasas.

6.4.4- Efecto sobre proteínas.

Las altas presiones afectan a la termodinámica de las proteínas y favorecen las reacciones que resultan en una disminución del volumen. De este modo, los efectos de la presión sobre las proteínas están principalmente relacionados con la modificación de interacciones y enlaces de tipo no covalente, y con su reordenación a nivel intra e intermolecular. En base a esto se considera que en general las altas presiones no afectan a la estructura primaria de las proteínas, la estructura secundaria puede verse ligeramente modificada, y sí que pueden resultar ampliamente alteradas

las estructuras terciaria y cuaternaria. Estas alteraciones pueden llegar incluso a hacerse irreversibles según factores como temperatura, pH, concentración proteica e intensidad del tratamiento (Cheftel, 1995; Heremans, 1985). A continuación se describen más en detalle estos cambios:

- Estructura primaria. Presiones inferiores a 1000-1500 MPa no afectan a los enlaces covalentes, ya que su energía de enlace es muy alta (de 300 a 400 kJ/mol) y su compresibilidad mínima, por lo que la estructura primaria de las proteínas no suele verse comprometida (Mozhaev *et al.*, 1996).
- Estructura secundaria. Los puentes de hidrógeno, que son elementos clave para la estabilización de esta estructura, no son especialmente susceptibles a la presión ya que su energía de enlace es moderadamente alta (de 8 a 40 kJ/mol). No obstante sí que pueden verse afectados en cierto grado a presiones de 300 MPa, y presiones superiores pueden llegar a desestabilizarlos. Además se ha observado que la β -lámina es más estable y barorresistente que la α -hélice (Tauscher, 1995).
- Estructura terciaria. Se encuentra definida por interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, puentes disulfuro y enlaces iónicos, y todas ellas son altamente susceptibles a la presión ya que presentan energías de enlace inferiores a 12 kJ/mol. Esta estructura puede verse notablemente alterada a partir de presiones de tan solo 200 MPa, y a menudo de forma irreversible (Balny & Masson, 1993).
- Estructura cuaternaria. Esta estructura aparece en proteínas oligoméricas, y se encuentra estabilizada por puentes de hidrógeno que como ya se ha indicado no son especialmente susceptibles a la presión. También intervienen interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, que presentan bajos valores de energía de enlace (entre 4 y 12 kJ/mol) y son por tanto muy susceptibles a la presión. Esto hace que presiones de tan solo 150 MPa puedan inducir la alteración de la estructura cuaternaria y la disociación de macroestructuras en subunidades (Mozhaev *et al.*, 1996; Trespalacios, 2007).

Todo esto hace que la modificación y desnaturalización proteica por altas presiones se deba a una serie de efectos en cascada, que hace que las proteínas monoméricas no sufran desnaturalización a presiones inferiores a 400 MPa, aunque sí pueden desplegarse a presiones superiores. Y que las proteínas oligoméricas puedan disociarse y desplegarse a presiones superiores o iguales a 150 MPa (Silva & Weber, 1993; Gross & Jaenicke, 1994; Mozhaev *et al.*, 1996). La presión primero afecta a las interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, desestabilizando la estructura terciaria y cuaternaria. Como consecuencia la proteína se despliega y quedan

expuestos al medio los grupos hidrofóbicos, produciéndose entonces un fenómeno de “electrostricción” alrededor de los grupos cargados por el que el agua se reorganiza alrededor de los grupos apolares expuestos y se establecen puentes de hidrógeno entre grupos polares. Cuando cesa la presión, los grupos hidrofóbicos vuelven a interaccionar entre ellos para tratar de minimizar su exposición al medio acuoso (Lanier, 1998). Según la intensidad del tratamiento, el tipo de proteína y su concentración, y las condiciones del medio, las altas presiones van a inducir la rotura y formación de nuevas interacciones no covalentes, lo que puede dar lugar a disociación de subunidades proteicas (Ruan & Weber, 1988,1989,1993; Foguel & Weber, 1995; Cioni & Strambini, 1996), agregación proteica (Aoki *et al.*, 1968; Schmid *et al.*, 1979) o gelificación (Bridgman, 1914).

En conclusión, a presiones entre 150 y 200 MPa, y temperatura ambiente puede producirse en muchos casos la disociación y despliegue de macroestructuras proteicas. Según va aumentando la presión se ve favorecida la disociación de agregados y el replegamiento proteico. Por encima de 400 MPa puede producirse el despliegue e incluso la desnaturalización de proteínas monoméricas, así como agregaciones, precipitación y gelificación (Silva & Weber, 1993; Gross & Jaenicke, 1994; Funtenberger *et al.*, 1995; Tauscher, 1995; Mozhaev *et al.*, 1996; Seefeldt *et al.*, 2009). Todos estos procesos de agregación, desnaturalización y gelificación proteica inducidos por la presión son sin embargo distintos a los inducidos por la temperatura, entre otras cosas porque no implican la alteración de los enlaces covalentes. Estas agregaciones y geles formados por presión son menos firmes pero más elásticos, extensibles, lisos y brillantes, y conservan mejor el color y el aroma (Cheftel, 1992; Van Camp & Huyghebaert, 1995; Zasytkin *et al.*, 1996; Heremans *et al.*, 1997; Dumay *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 2005).

En el caso específico de las enzimas, la respuesta a la presión es muy variable según el tipo de enzima, el sustrato, temperatura e intensidad del tratamiento con altas presiones (Palou *et al.*, 1999). Además su comportamiento es distinto cuando se extraen de su matriz original que cuando se encuentran en el alimento (Hendrickx *et al.*, 1998). En general se considera que presiones superiores a 400 MPa pueden inducir cambios conformacionales, alterar el centro activo e inactivar al enzima (Morild, 1981). Sin embargo hay algunas enzimas que se inactivan a presiones muy inferiores, de tan solo 100 MPa (Rovere, 1995) y otras son mucho más resistentes, como la ATPasa dependiente de calcio, que llega a resistir presiones de hasta 1000 MPa (Farr, 1990; Asaka & Hayashi, 1991). Incluso en algunos casos se ha observado que se puede producir la activación del enzima por la presión. Así por ejemplo en el caso de la polifenoloxidasas y las amilasas, presiones de 400 MPa las activan, requiriéndose más de 800 MPa para su inactivación (Gomes *et al.*, 1998; Weemaes *et al.*, 1998). La

temperatura favorece la inactivación enzimática por la presión, pero en general se ha observado una tendencia en la resistencia a la presión (Seyderhelm *et al.*, 1996) que en orden creciente es como sigue: lipoxigenasa < lactoperoxidasa < pectinesterasa < lipasa < fosfatasa < catalasa < α -amilasa, β -amilasa y polifenoloxidasas < peroxidasa < Ca-ATPasa.

6.4.5- Efecto sobre vitaminas.

En general se considera que las vitaminas prácticamente no resultan afectadas por las altas presiones.

6.5- **Aplicaciones.**

Como ya se ha indicado, la utilidad de las altas presiones para el procesado y conservación de los alimentos fue apuntada por Hite a finales del siglo XIX, pero no logró adquirir importancia y aplicación comercial hasta estas últimas décadas. Gracias a los avances tecnológicos y al progreso en el diseño de equipos, en los últimos años se ha despertado un fuerte y creciente interés de cara a su aplicación en muy diversos campos. A continuación se recogen algunas de sus aplicaciones:

6.5.1- Conservación de alimentos.

El tratamiento con altas presiones es una alternativa a los tratamientos térmicos convencionales para la destrucción microbiana, ya que permite procesar el producto a temperatura ambiente e incluso a alta temperatura si se desea. Se considera que permite alargar la vida útil y comercial de los productos de forma similar a la pasteurización, al ser capaz de eliminar la microbiota vegetativa patógena y alterante (Tauscher, 1995; Patterson, 2005; Palou *et al.*, 2007; Considine *et al.*, 2008). Permite así obtener productos seguros y de calidad organoléptica superior, ya que al no ser necesarias altas temperaturas los productos se ven menos modificados en sus propiedades que con otros tratamientos de conservación. Además, en ciertos productos la presurización permite la estabilización de compuestos termosensibles como aromas, nutrientes y compuestos bioactivos (Jaenicke, 1991). Otra utilidad potencial, aunque de difícil aplicación en la práctica, es la conservación de alimentos a temperatura de congelación (bajo cero) sin que realmente éstos lleguen a congelarse (Urrutia *et al.*, 2004).

Las altas presiones no sólo permiten destruir las formas vegetativas de los principales patógenos y alterantes de los alimentos, sino también inactivar o reducir la actividad de algunas enzimas responsables del deterioro del alimento (principalmente en frutas y vegetales). E incluso algunos estudios indican que podrían reducir la alergenicidad de ciertos alimentos, como la carne (Suzuki, 2000). Todo esto hace que

en la actualidad la tecnología de las altas presiones se esté empleando en muy diversos alimentos en Estados Unidos, Europa y Japón (ver Tabla 6 y Figura 6). Así por ejemplo se aplica en múltiples productos RTE (principalmente cárnicos), productos derivados del aguacate (guacamole), salsas, zumos, compotas, mermeladas y mariscos. En zumos de frutas y en vegetales las altas presiones permiten su conservación a temperatura ambiente ya que se alcanza la inactivación de mohos, levaduras y bacterias, logrando estabilizar el producto y conservar la textura y características organolépticas, así como ciertas vitaminas como la A y la C (Sila *et al.*, 2008). Sin embargo, para lograr la inactivación de enzimas como polifenoloxidasas o enzimas pectolíticas se requiere un tratamiento térmico moderado combinado (Farr, 1990). En gazpacho, la presurización combinada con un tratamiento térmico moderado destruye los microorganismos e inactiva enzimas, alargando la vida útil del producto en refrigeración y mejorando su color y textura (Daoudi, 2004). En leche y lácteos las altas presiones alcanzan una eficacia similar a la pasteurización a 72 °C durante 15 segundos (Buffa *et al.*, 2001), y en quesos logran además reducir el tiempo de maduración (Capellas *et al.*, 1996; Saldo *et al.*, 2000). En ovoproductos el tratamiento con altas presiones se presenta como una alternativa viable a la pasteurización clásica del huevo líquido (Cheftel, 1992).

El procesado con altas presiones puede aplicarse a alimentos sólidos y líquidos, y son particularmente buenos candidatos los alimentos con pH ácido. Por el contrario, en productos de baja acidez puede emplearse para alargar la vida útil en refrigeración y disminuir el riesgo de desarrollo de patógenos como *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria*, pero no permite asegurar la completa destrucción de esporas si no se aplica alta temperatura. Una alternativa para estos productos de baja acidez sería el empleo de las altas presiones combinado con temperatura o incluso un pretratamiento térmico anterior a las altas presiones, aunque obviamente esto podría repercutir en las características organolépticas o aspecto del producto (Rovere, 1995). Otra limitación del tratamiento con altas presiones es que para que resulte totalmente eficaz el producto debe tener cierta humedad y no tener burbujas de aire. Productos muy secos (con baja actividad de agua) protegerían a los microorganismos del efecto microbicida de las altas presiones, mientras que productos que retienen aire podrían deformarse o romperse durante el tratamiento. Hasta la fecha no existe ningún estudio que indique posibles efectos tóxicos o adversos de los productos tratados con esta tecnología, aunque habría que tener en cuenta que las altas presiones pueden modificar la estructura proteica, la actividad de algunas enzimas y las interacciones moleculares, por lo que quizás podrían surgir ciertos problemas de pérdida de digestibilidad y calidad nutricional, posibles toxicidades y desarrollo de problemas antigénicos (Hugas *et al.*, 2002). En España la comercialización de productos sometidos a altas presiones

está regulada por el Reglamento Comunitario CE 258/97 y CE 424/2001, que contemplan los “nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios” y que consideran a los productos presurizados como productos sometidos a pasteurización por presión (baropasteurización). En España los productos presurizados deben seguir la normativa aplicable a los productos pasteurizados, mientras que en USA la legislación es mucho más permisiva, e indica que es la empresa comercializadora de estos productos el garante de su seguridad alimentaria, y simplemente se exige la destrucción o ausencia de *L. monocytogenes* en los productos cárnicos presurizados RTE.

6.5.2- Transformación de productos.

Esta aplicación trata de aprovechar el efecto de las altas presiones sobre ciertos componentes de los alimentos, con el fin de desarrollar nuevas funcionalidades, texturas o formas de presentación (Ponce *et al.*, 1999a). Mediante esta tecnología se pueden preparar soluciones de proteínas, hidrocoloides o carbohidratos como el almidón, obteniendo geles de modo alternativo a la texturización por temperatura. Se obtienen así estructuras más estables y se mejora el ligado o retención de aromas y sabores. Así por ejemplo en ovoproductos se pueden obtener geles de huevo o de clara o de yema (Cheftel, 1992). En productos cárnicos cocidos y RTE, así como en carnes recuperadas mecánicamente y reestructuradas, la presurización puede aplicarse para obtener nuevos productos, texturas y formas de presentación. Se ha observado que presiones inferiores o iguales a 200 MPa pueden mejorar la textura, cohesión y rendimiento post-cocción de emulsiones y productos cárnicos (Mandava *et al.*, 1994; Yuste *et al.*, 1999). Esto mismo es aplicable para pescados, de tal modo que las altas presiones pueden emplearse para la obtención de nuevos productos y geles de pescado (Yoshika *et al.*, 1992).

6.5.3- Apertura de crustáceos y moluscos.

Las altas presiones permiten aumentar la vida útil de crustáceos y moluscos ya que logran disminuir la carga microbiana de patógenos y alterantes, e incluso virus (Sheldon *et al.*, 2008), pero además permiten una apertura mucho más sencilla de las valvas y una retirada más fácil del caparazón o exoesqueleto (Oshima *et al.*, 1993). En Estados Unidos se aplica ya a gran escala para la apertura de ostras, aunque esto en Europa sería de menor utilidad ya que se aprecia el animal vivo. También se usa para facilitar la retirada del exoesqueleto en langosta y otros crustáceos, y además aumenta el rendimiento.



Figura 6. Ejemplos de productos RTE presurizados, actualmente comercializados. Incluyendo: 1) productos cárnicos, 2) productos de la pesca, 3) lácteos, zumos, y platos preparados de vegetales y/o pasta.

Tabla 6. Alimentos tratados por altas presiones comercializados en la actualidad.

Producto	Compañía	País
Zumos	Donny Boy Fresh Food Ehime Co. Frucaba Fruity Line Invo Jumex K-Sun Odwalla Orchard House Foods Ltd. Ortogel Pampryl Peinod Ricard Pokka Pon Preshafruit Takansi Wakayana Food Int.	Australia Japón Portugal Holanda España Méjico Líbano USA UK Italia Francia Francia Japón Japón Australia Japón Japón
Mermeladas, frutas y gelatinas	Donny Boy Fresh Food Fruity Line Meidi-Ya Nisshin Fine Foods	Australia Holanda Japón Japón
Lácteos	Col+ Fonterra Kaneka Corp. Meidi-Ya Orchard House Foods Ltd.	Nueva Zelanda Nueva Zelanda Japón Japón UK
Guacamole y otras salsas	Avomex Faroc Meidi-Ya Verfruco	Méjico y USA Méjico Japón Méjico y USA
Productos de pescado y mariscos RTE	Campofrío Echigo Seika Joey Motivatit Seafoods MRM Nisbet Oyster Ocean Choice Int.	España Japón USA USA España USA Canadá
Productos cárnicos RTE	Abraham Campofrío Creta Farms España Foster Farms Itoham Corp. Ltd. Martiko Moir Mac's MRM Tyson Zwanenberg	Italia España Italia y USA España USA Japón España Australia España Méjico y USA Países Bajos
OTROS: Arroz Hummus Pasta y/o vegetales RTE Sake Sandwiches y rellenos	Echigo Seika Hannah International Foods Grupo Ian (Carretilla) Chiyosono Rodilla	Japón USA España Japón España

6.5.4- Otras aplicaciones.

Bajo este epígrafe se encuentran diversos usos potenciales de la presurización como:

- Acelerar fermentaciones microbianas. Para esto se emplean presiones moderadas, entre 10 y 60 MPa, que permiten acelerar la fermentación de glucosa en etanol por *S. cerevisiae* (Kunugi & Nomura, 1990), o la fermentación de celobiosa en etanol por *Clostridium thermocellum* (Bothun *et al.*, 2004).
- Mejorar ciertas características de probióticos o cultivos estériles. Así por ejemplo se ha visto que el tratamiento de *L. rhamnosus* GG con 100 MPa durante 10 min incrementa su termotolerancia (Ananta & Knorr, 2004).
- Mejorar la aptitud de las células para la crioconservación y/o a técnicas de reproducción *in vitro*. Se ha visto que la aplicación de presiones entre 20 y 40 MPa durante 90-120 minutos, sobre espermatozoides de toro antes de la congelación mejora la calidad y supervivencia de los gametos a la descongelación (Pribenszky *et al.*, 2007). Además hay estudios que indican que la presurización facilita o provoca la activación partenogénica de oocitos, y mejora la competencia y respuesta de los gametos a los métodos y técnicas de clonación (Du *et al.*, 2008; Pribenszky *et al.*, 2008).
- Desarrollo de vacunas antitumorales (Korn *et al.*, 2004) y desvitalización de tejidos infectivos o tumorales (por ejemplo de tejido óseo) para su posterior reimplantación (Diehl *et al.*, 2008).
- Inhibición o retraso de la germinación de semillas, por ejemplo mediante presurización entre 200 y 400 MPa durante 15 minutos (Wuytack *et al.*, 2003).
- Estimular el desarrollo y crecimiento de la biomasa, por ejemplo tras el tratamiento de las semillas a menos de 75 MPa durante 12 horas (Shuang *et al.*, 2003).

6.6- Efectos de la presurización sobre la carne.

El uso de las altas presiones para la conservación de la carne y los productos cárnicos representa una interesante opción como alternativa a los tratamientos convencionales. Son muchos los estudios que demuestran el efecto antimicrobiano del tratamiento con altas presiones en carne y sus derivados tanto frente a levaduras como *Candida* y *Saccharomyces* (Shigehisa *et al.*, 1991; Garriga *et al.*, 2002), como frente a bacterias patógenas y alterantes, gram positivas como

Bacillus, *Listeria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Shigehisa *et al.*, 1991; Carlez *et al.*, 1992; Mussa *et al.*, 1999; Garriga *et al.*, 2002), y gram negativas como *Citrobacter*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Yersinia* (Shigehisa *et al.*, 1991; Carlez *et al.*, 1992; Carlez *et al.*, 1994; Garriga *et al.*, 2002). Los tratamientos aplicados varían entre 200 y 800 MPa, durante 1 y 60 minutos, a temperaturas desde refrigeración hasta más de 30 °C. Sin embargo, se busca que el tratamiento sea lo menos intenso posible, aunque sin perder su eficacia antimicrobiana ya que, como a continuación se describirá, la presurización puede inducir cambios de textura y color y favorecer la oxidación lipídica en el producto.

Las altas presiones pueden afectar a la textura de la carne (Sun & Holley, 2010), principalmente por alteración de las proteínas miofibrilares, ya que otros componentes implicados en la textura, como el colágeno, resultan poco afectados al estar estabilizados por enlaces covalentes y puentes de hidrógeno (Gekko & Koga, 1983). La miosina es especialmente susceptible a la desnaturalización por altas presiones. La cabeza de miosina experimenta un aumento de polaridad alrededor de los residuos de triptófano como consecuencia de la presión, quedando así expuestas a la superficie regiones internas hidrofóbicas. Finalmente la cola puede sufrir una disociación parcial de la cadena helicoidal polipeptídica (Iwasaki & Yamamoto, 2003). Presiones entre 100 y 300 MPa aumentan la hidrofobicidad de la miosina induciendo cambios estructurales (Yamamoto *et al.*, 1994). A partir de 200 MPa pueden formarse agregados por interacción entre las cabezas de miosina (Yamamoto *et al.*, 1993). A partir de 300 MPa se ve alterada la estructura secundaria, disminuyendo su contenido en α -hélice (Yamamoto *et al.*, 1994) y apareciendo también cambios estructurales en los sitios de unión de la miosina con la actina y la ATPasa (Iwasaki & Yamamoto, 2002), produciéndose la disociación de la actomiosina (Ikkai & Ooi, 1969; Ikeuchi *et al.*, 2002) y pudiendo verse desnaturalizada y despolimerizada la actina (Ikkai & Ooi, 1966; Swezey & Somero, 1985; Garcia *et al.*, 1992; Ikeuchi *et al.*, 2002).

La presurización puede inducir en la carne cambios de color por modificación de su principal pigmento, la mioglobina. Es capaz de producir la desnaturalización de la globina, el desplazamiento o liberación del grupo hemo, y la oxidación del átomo ferroso (Cheftel & Culioli, 1997; Hugas *et al.*, 2002). Presiones entre 200 y 350 MPa son capaces de provocar la decoloración de la carne, que aparecerá más clara y menos roja (se ve aumentado el parámetro colorimétrico L^* ó luminosidad) adquiriendo un aspecto de carne cocida. Esto se produce por la disminución del contenido en mioglobina (de color rojo oscuro) y oximioglobina (de color rojo brillante). Presiones superiores a 400 MPa inducen un aumento en la metamioglobina (de color gris-pardo) por oxidación de la mioglobina (Carlez *et al.*, 1995), de tal modo que la carne adquiere un tono oscuro y marrón (se ve disminuido el parámetro colorimétrico a^* , de tendencia

al rojo). Así por ejemplo, en pollo se ha observado que tratamientos de 500 MPa durante 60 minutos provocan cambios intensos en el color, superiores a los inducidos por un tratamiento térmico (de 90 °C durante 15 minutos), y que la magnitud de este efecto aumenta con la intensidad de presurización y con la temperatura empleada (Beltrán Torres, 2004).

En general se considera que la presurización por debajo de 300 MPa no afecta a la oxidación lipídica en carne, mientras que presiones superiores a 400 MPa inducen un rápido incremento de este proceso (Cheah & Ledward, 1996). Esto podría explicarse por la liberación de cationes metálicos, ligados a enzimas y proteínas, por efecto de las modificaciones estructurales inducidas por la presión, los cuales actuarían como catalizadores de las reacciones de oxidación lipídica (Cheah & Ledward, 1997).

Vemos por tanto que además de su efecto antimicrobiano, la presión puede inducir una serie de cambios físico-químicos y organolépticos en la carne. Tratamientos de 300 MPa entre 5 y 20 minutos tienen un efecto letal y subletal sobre los microorganismos presentes en hamburguesas, pero alteran su color y textura (Carballo *et al.*, 1996,1997). Sin embargo, en productos cárnicos cocidos y en productos curados (como jamón y lomo) estos cambios son prácticamente inapreciables (Cheftel & Culioli, 1997; Cava *et al.*, 2009), por lo que la presurización sería una opción interesante para alargar la vida útil de estos productos. Incluso en algunos casos, estos cambios de color y textura podrían ser deseables para el desarrollo de nuevos productos y nuevas formas de presentación.

Otra posible aplicación de las altas presiones en carne estaría relacionada con su efecto sobre el acondicionamiento o maduración de la carne, que podría verse acelerado (Macfarlane, 1973; Bouton *et al.*, 1977; Suzuki *et al.*, 1992). La aplicación de las altas presiones previa al *rigor mortis* puede modificar el proceso de tenderización de la carne, como consecuencia de la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico por la desintegración de membranas, que pasaría al citosol causando un descenso del pH y una contracción intensa del músculo. Sin embargo, la aplicación de altas presiones tras el *rigor mortis* no produce contracción muscular, aunque sí altera la estructura de los sarcómeros y podría incrementar la actividad de las catepsinas y calpainas. No obstante, las investigaciones y resultados en este campo aún no son concluyentes, e incluso se considera la posibilidad de combinar la presión con aplicación de temperatura para aumentar la tenderización de la carne, pero podría verse alterado el color y aspecto.

Referencias:

- Abbott SL, Cheung WKW & Janda JM. (2003). The Genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification scheme. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2348-2357.
- Abdallah FB & Chahine JMEH. (2000). Transferrins: iron release from lactoferrin. *Journal of Molecular Biology*, 303: 255-266.
- Abee T & Wouters JA. (1999). Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 65-91.
- Abrink M, Larsson E, Gobl A & Hellman L. (2000). Expression of lactoferrin in the kidney: implications for innate immunity and iron metabolism. *Kidney International*, 57: 2004-2010.
- Actor JK, Hwang SA & Kruzel ML. (2009). Lactoferrin as a natural immune modulator. *Current Pharmaceutical Design*, 15: 1956-1973.
- Adlerova L, Bartoskova A & Faldyna M. (2008). Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina*, 53: 457-468.
- Agiato LA & Dyer DW. (1992). Siderophore production and membrane alterations by *Bordetella pertussis* in response to iron starvation. *Infection and Immunity*, 60: 117-123.
- Aguilera O, Andres MT, Heath J, Fierro JF & Douglas CW. 1998. Evaluation of the antimicrobial effect of lactoferrin on *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 21: 29-36.
- AICE. (2010). Asociación de Industrias de la Carne de España. www.aice.es
- Aisen P & Leibman A. (1972). Lactoferrin and transferrin: a comparative study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 257: 314-323.
- Ajello M, Greco R, Giansanti F, Massucci MT, Antonini G & Valenti P. (2002). Anti-invasive activity of bovine lactoferrin towards group A streptococci. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 119-124.
- Akhtar S, Paredes-Sabja D, Torres JA & Sarker MR. (2009). Strategy to inactivate *Clostridium perfringens* spores in meat products. *Food Microbiology*, 26: 272-277.
- Al-Majali AM, Ismail ZB, Al-Hami Y & Nour AY. 2007. Lactoferrin concentration in milk from camels (*Camelus dromedarius*) with and without subclinical mastitis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 5: 120-124.
- Alpas H, Kalchayanand N, Bozoglu F, Sikes A, Dunne CP & Ray B. (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of foodborne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4248-4251.
- Alpas H, Kalchayanand N, Bozoglu F & Ray B. (2000). Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant

- and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 60: 33-42.
- Alugupalli KR & Kalfas S. (1996). Degradation of lactoferrin by periodontitis-associated bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 145: 209-214.
- Alugupalli KR & Kalfas S. (1997). Characterization of the lactoferrin-dependent inhibition of the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* to fibroblasts and to a reconstituted basement membrane. *Acta Parthologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 105: 680-688.
- Amini AA & Nair LS. (2011). Lactoferrin: a biologically active molecule for bone regeneration. *Current Medicinal Chemistry*, 18: 1220-1229.
- Ammendolia MG, Bertuccini L, Iosi F, Minelli F, Berlutti F, Valenti P & Superti F. (2010). Bovine lactoferrin interacts with cable pili of *Burkholderia cenocepacia*. *Biometals*, 23: 531-542.
- Ammons MCB, Ward LS, Doud S & James GA. (2011a). Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with lactoferrin and xylitol inhibits the ability of bacteria to respond to damage resulting from lactoferrin iron chelation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37: 316-323.
- Ananta E & Knorr D. (2004). Evidence on the role of protein biosynthesis in the induction of heat tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG by pressure pre-treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 307-313.
- Andersen JH, Jenssen H, Sandvik K & Gutteberg TJ. (2004). Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. *Journal of Medical Virology*, 74: 262-271.
- Anderson BF, Baker HM, Norris GE, Rice DW & Baker EN. (1989). Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 209: 711-734.
- Andrä J, Lohner K, Blondelle SE, Jerala R, Moriyon I, Koch MHJ, Garidel P & Brandenburg K. (2005). Enhancement of endotoxin neutralization by coupling of a C12-alkyl chain to a lactoferricin-derived peptide. *Biochemistry Journal*, 385: 135-143.
- Andrés MT, Viejo-Diaz M, Pérez F & Fierro JF. (2005). Antibiotic tolerance induced by lactoferrin in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 1613-1616.
- Andrés MT & Fierro JF. (2010). Antimicrobial mechanism of action of transferrins: selective inhibition of H⁺-ATPase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 4335-4342.
- Antonini G, Catania MR, Greco R, Longhi C, Pisciotta MG, Seganti L & Valenti P. (1997). Antiinvasive activity of bovine lactoferrin towards *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 3: 267-271.

- Aoki K, Hiramatsu K, Tanaka M & Kaneshina S. (1968). Bovine serum albumin exposed to high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 160: 368-377.
- Appel MJ, Van Veen HA, Vietsch H, Salaheddine M, Nuijens JH, Ziere B & de Loos F. (2006). Sub-chronic (13-week) oral toxicity study in rats with recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 964-973.
- Appelmeijer BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, de Graaf J & Nuijens JH. (1994). Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infection and Immunity*, 62: 2628-2632.
- Appendini P & Hotchkiss JH. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3:113-126.
- Arnold RR, Cole MF & McGhee JR. (1977). A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*, 197: 263-265.
- Arnold RR, Brewer M & Gauthier JJ. (1980). Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infection and Immunity*, 28: 893-898
- Arnold RR, Russell JE, Champion WJ & Gauthier JJ. (1981). Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. *Infection and Immunity*, 32: 655-660.
- Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Brewer M & Gauthier JJ. (1982). Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infection and Immunity*, 35: 792-799.
- Arnold D, Di Biase AM, Marchetti M, Pietrantonio A, Valenti P, Seganti L & Superti F. (2002). Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection. *Antiviral Research*, 53: 153-158.
- Artym J & Zimecki M. (2007). The effects of lactoferrin on myelopoiesis: can we resolve the controversy?. *Postępy Higieny i Medycyny Dóświadczalnej* (online), 61: 129-150.
- Asaka M & Hayashi R. (1991). Activation of polyphenoloxidases in pear fruit by high pressure treatment. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55: 2439-2440.
- Ascencio F, Ljungh A & Wadstrom T. (1992). Characterization of lactoferrin binding by *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 42-47.
- Ashida K, Sasaki H, Suzuki AY & Lönnnerdal B. (2004). Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals*, 17: 311-315.
- Atef Yekta M, Verdonck F, Van den Broeck W, Goddeeris BM, Cox E & Vanrompay D. (2010). Lactoferrin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 growth and attachment to intestinal epithelial cells. *Veterinarni Medicina*, 55: 359-368.
- Atef Yekta M, Cox E, Goddeeris BM & Vanrompay D. (2011). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 excretion in sheep by oral lactoferrin administration. *Veterinary Microbiology*, 150: 373-378.

- Aymerich T, Picouet PA & Monfort JM. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78: 114-129.
- Ayres JC. (1960). Temperature relationship and some other characteristics of the microbial flora developing on refrigerated beef. *Food Research*, 25:1-18.
- Baccus-Taylor G, Glass KA, Luchansky JB & Maurer AJ. (1993). Fate of *Listeria monocytogenes* and pediococcal starter cultures during the manufacture of chicken summer sausage. *Poultry Science*, 72: 1772-1778.
- Bai X, Teng D, Tian Z, Zhu Y, Yang Y & Wang J. (2010). Contribution of bovine lactoferrin inter-lobe region to iron binding stability and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. *Biometals*, 23: 431-439.
- Baker EN, Baker HM & Kidd RD. (2002). Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structural framework. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 27-34.
- Baker EN & Baker HM. (2005). Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 2531-2539.
- Balny C & Masson P. (1993). Effects of high-pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9: 611-628.
- Bari ML, Ukuku DO, Mori M, Kawamoto S & Yamamoto K. (2008). Effect of hydrostatic pressure pulsing on the inactivation of *Salmonella* Enteritidis in liquid whole egg. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5: 175-182.
- Beddek AJ & Schrivvers AB. (2010). The lactoferrin receptor complex in gram negative bacteria. *Biometals*, 23: 377-386.
- Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K & Tomita M. (1992a). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1121: 130-136
- Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K & Tomita M. (1992b). Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 472-479.
- Bellamy W, Wakabayashi H, Takase M, Kawase K, Shimamura S & Tomita M. (1993). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-termina region of bovine lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology*, 182: 97-105.
- Beljaars L, Van der Strate BW, Bakker HI, Reker-Smith C, Van Loenen-Weemaes AM, Wiegman FC, Harmsen MC, Molema G & Meijer DK. (2004). Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, 63: 197-208.
- Beltrán E, Pla R, Yuste J & Mor-Mur M. (2003). Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Science*, 64: 19-25.

- Beltrán Torres E. (2004). Alta presión isostática: estudio del color y de la fracción lipídica de productos avícolas. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Planta de Tecnología de los Alimentos, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Benito A, Ventoura G, Casadei M, Robinson T & Mackey B. (1999). Variation in resistance of natural isolation of *Escherichia coli* O157 to hydrostatic pressure, mild heat and other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1564-1569.
- Bennat DJ & McAbee DD. (1997). Identification and isolation of a 45-kDa calcium-dependent lactoferrin receptor from rat hepatocytes. *Biochemistry*, 36: 8359-8366.
- Bennett RM & Kokocinski T. (1978). Lactoferrin concentration of peripheral blood cells. *British Journal of Haematology*, 39: 509-521.
- Bennett RM & Davis J. (1982). Lactoferrin interacts with deoxyribonucleic acid: a preferential reactivity with double-stranded DNA and dissociation of DNA-anti-DNA complexes. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 99: 127-138.
- Bennett RM, Meritt MM & Gabor G. (1986). Lactoferrin binds to neutrophilic membrane DNA. *British Journal of Haematology*, 63: 105-117.
- Berkhout B, Floris R, Recio I & Visser S. (2004). The antiviral activity of the milk protein lactoferrin against the human immunodeficiency virus type 1. *Biometals*, 17: 291-294.
- Berlov MN, Korableva ES, Andreeva YV, Ovchinnikova TV & Kokryakov VN. (2007). Lactoferrin from canine neutrophils: isolation and physicochemical and antimicrobial properties. *Biochemistry (Moscow)*, 72: 445-451.
- Berlutti F, Ajello M, Bosso P, Morea C, Antonini G & Valenti P. (2004). Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Biometals*, 17: 271-278.
- Bessler HC, de Oliveira IR & Giugliano LG. (2006). Human milk glycoproteins inhibit the adherence of *Salmonella typhimurium* to HeLa cells. *Microbiology and Immunology*, 50: 877-882.
- Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J & Furmanski P. (1994). Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Research*, 54: 2310-2312.
- Bezwoda WR & Mansoor N. (1989). Lactoferrin from human breast milk and from neutrophil granulocytes. Comparative studies of isolation, quantization, characterization and iron binding properties. *Biomedical Chromatography*, 3: 121-126.
- Bhimani RS, Vendrov Y & Furmanski P. (1999). Influence of lactoferrin feeding and injection against systemic staphylococcal infections in mice. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 135-144.
- Bilgili SF. (2002). Poultry meat processing and marketing-What does the future hold?. *Poultry International*, 9: 12-22.

- Birgens HS, Karle H, Hansen NE & Kristensen LO. (1984). Lactoferrin receptors in normal and leukaemic human blood cells. *Scandinavian Journal of Haematology*, 33: 275-280.
- Blakeborough P, Salter DN & Gurr MI. (1983). Zinc binding in cow's milk and human milk. *Biochemical Journal*, 209: 505-512
- Blanton KJ, Biswas GD, Tsai J, Adams J, Dyer DW, Davis SM, Kich GG, Sen PK & Sparling PF. (1990). Genetic evidence that *Neisseria gonorrhoeae* produces specific receptors for transferrin and lactoferrin. *Journal of Bacteriology*, 172: 5225-5235.
- Blom H, Nerbrink E, Dainty R, Hagtvedt T, Borch E, Nissen H & Nesbakken T. (1997). Addition of 2.5% lactate and 0.25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, sensory-acceptable servelat sausage and cooked ham stored at 4 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 38: 71-76.
- Boman HG. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*, 13: 61-92.
- Boman HG, Nilsson I & Rasmuson B. (1972). Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature*, 237: 232-235.
- Borch E, Kant-Muermans ML & Blixt Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 103-120.
- Borges Mano S. (1997). Comportamiento de la microbiota natural y *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia enterocolitica* en carne envasada en atmosferas modificadas. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, UCM.
- Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillar C, Maes P, García MT & Ventosa A. (1996). *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 480-484.
- Bortner CA, Miller RD & Arnold RR. (1986). Bactericidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 51: 373-377.
- Bothun GD, Knutson BL, Berberich JA, Strobel HJ & Nokes SE. (2004). Metabolic selectivity and growth of *Clostridium thermocellum* in continuous culture under elevated hydrostatic pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 149-157.
- Bouton PE, Harris PV, Macfarlane JJ & O'shea JM. (1977). Effects of pressure treatment on the mechanical properties of pre- and post-rigor meat. *Meat Science*, 1: 307-318.
- Branen J & Davidson PM. 2000. Activity of hydrolysed lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria in growth media: the effect of EDTA. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 233-237.
- Brauch UH & Ludwig H. (1990). The effect of pressure on bacteriophage. *High Pressure Research*, 5: 767-769.
- Braun V & Killmann H. (1999). Bacterial solutions to the iron supply problem. *Trends in Biochemical Sciences*, 24: 104-109

- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R & Swaminathan B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 2465-2467.
- Breton M, Mariller C, Baïssa M, Caillaux K, Browaeys E, Masson M, Vilain JP, Mazurier J & Pierce A. (2004). Expression of delta-lactoferrin induces cell cycle arrest. *Biometals*, 17: 325-329.
- Bridgman PW. (1914). The coagulation of albumen by pressure. *The Journal of Biological Chemistry*, 19: 511-512.
- Brisson G, Britten M & Pouliot Y. (2007). Heat-induced aggregation of bovine lactoferrin at neutral pH: effect of iron saturation. *International Dairy Journal*, 17: 617-624.
- Britigan BE, Lewis TS, Waldschmidt M, McCormick ML & Krieg AM. (2001). Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells. *The Journal of Immunology*, 167: 2921-2928.
- Britz P, Funtenberger S, Haberditzl T & Tauscher B. (1996). High pressure inactivation of *Byssoschlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29: 404-410.
- Brock JH. (1980). Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. *Archives of Disease in Childhood*, 55: 417-421.
- Brock JH, Pickering MG, McDowall MC & Deacon AG. (1983). Role of antibody and enterobactin in controlling growth of *Escherichia coli* in human milk and acquisition of lactoferrin- and transferrin-bound iron by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 40: 453-459.
- Brock JH. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 1-6.
- Brogan TD, Ryley HC, Neale L & Yassa J. (1975). Soluble proteins of bronchopulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, asthma and bronchitis. *Thorax*, 30: 72-79.
- Brown P, Meyer R, Cardone F & Pocchiari M. (2003). Ultra-high-pressure inactivation of prion infectivity in processed meat: a practical method to prevent human infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 6093-6097.
- Brown CA, Wang B & Oh JH. (2008). Antimicrobial activity of lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria incorporated into edible chitosan film. *Journal of Food Protection*, 71: 319-324.
- Broxmeyer HE & Platzer E. (1984). Lactoferrin acts on I-A and I-E/C antigen+ subpopulations of mouse peritoneal macrophages in the absence of T lymphocytes and other cell types to inhibit production of GM-CSF in vitro. *Journal of Immunology*, 133: 306-313.
- Buccigrossi V, de Marco G, Bruzzese E, Ombrato L, Bracale I, Polito G & Guarino A. (2007). Lactoferrin induces concentration-dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation. *Pediatric Research*, 61: 410-414.

- Buchheim W & El Nour AMA. (1992). Induction of milkfat crystallization in the emulsified state by high hydrostatic pressure. *Fett Wissenschaft Technologie*, 94: 369-373.
- Buffa M, Guamis B, Royo C & Trujillo AJ. (2001). Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high pressure-treated milk. *Food Microbiology*, 18: 45-51.
- Bullen JJ, Rogers HJ & Leigh L. (1972). Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *British Medical Journal*, 1: 69-76
- Butler JE. (1973). The occurrence of immunoglobulin fragments, two types of lactoferrin-IgG2 complex in bovine colostrum and milk whey. *Biochimica et Biophysica Acta*, 295: 341-351.
- Buyong N, Kok J & Luchanski JB. (1998). Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4842-4845.
- Byrd TF & Horwitz MA. (1991). Lactoferrin inhibits or promotes *Legionella pneumophila* intracellular multiplication in nonactivated and interferon gamma-activated human monocytes depending upon its degree of iron saturation. *Journal of Clinical Investigation*, 88: 1103-1112.
- Caccavo D, Rigon A, Picardi A, Galluzzo S, Vadacca M, Ferri GM, Amoroso A & Afeltra A. (2005). Anti-lactoferrin antibodies in systemic lupus erythematosus: isotypes and clinical correlates. *Clinical Rheumatology*, 24: 381-387.
- Calci KR, Meade GK, Tezloff RC & Kingsley DH. (2005). High-pressure inactivation of hepatitis A virus within oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 339-343.
- Campagnary AA, Shanks KL & Dyer DW. (1994). Growth of *Moraxella catarrhalis* with human transferrin and lactoferrin: expression of iron-repressible proteins without siderophore production. *Infection and Immunity*, 62: 4909-4914.
- Campanini M, Pedrazzoni I, Barbuti S & Baldini P. (1993). Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 20: 169-175.
- Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompарт CM, Albertí S & Bengoechea JA. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*, 72: 7107-7114.
- Capellas M, Mor-Mur M, Sendra E, Pla R & Guamis B. (1996). Population of aerobic mesophils and inoculated *Escherichia coli* during storage of fresh goat's milk cheese treated with high pressure. *Journal of Food Protection*, 59: 582-587.

- Carballo J, Fernandez P & Jiménez-Colmenero F. (1996). Texture of uncooked and cooked low- and highfat meat batters as affected by high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1624-1625.
- Carballo J, Fernandez P, Carrascosa AV, Solas MT & Colmenero FJ. (1997). Characteristics of low- and high-fat beef patties: effect of high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 60: 48-53.
- Cardone F, Brown P, Meyer R & Pocchiari M. (2006). Inactivation of transmissible spongiform encephalopathy agents in food products by ultra high pressure-temperature treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764: 558-562.
- Carlez A, Cheftel JC, Rosec JP, Richard N, Saldana JL & Balny C. (1992). Effects of high pressure and bacteriostatic agents on the destruction of *Citrobacter freundii* in minced beef muscle. En: *High pressure and Biotechnology*. Balny C, Hayashi R, Heremans K & Masson P (eds). John Libbey & Co, London. pp. 365-368.
- Carlez A. (1994). Traitements par hautes pressions d'aliments d'origine musculaire: destruction microbienne, modification de couleur, gélification protéique. Thèse, Université Montpellier II. Montpellier.
- Carlez A, Veciana-Nogués MT & Cheftel JC. (1995). Changes in colour and myoglobin of minced meat due to high pressure processing. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 27: 48-54.
- Casadei MA, Mañas P, Niven G, Needs E & Mackey BM. (2002). Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC8164. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5965-5972.
- Cava R, Ladero L, González S, Carrasco A & Ramirez MR. (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 76-81.
- CE 2/95. (20 de febrero de 1995). Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes.
- CE 258/97. (27 de enero de 1997). Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.
- CE 424/2001. (23 de mayo de 2001). Decisión de la Comisión por la que se autoriza la comercialización de preparados pasteurizados a base de frutas obtenidos por medio de un tratamiento de pasteurización a alta presión con arreglo al Reglamento CE 258/97.
- Chan JCK & Li-Chan ECY. (2007). Production of lactoferricin and other cationic peptides from food grade bovine lactoferrin with various iron saturation levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 493-501.

- Chan DI, Prenner EJ & Vogel HJ. (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 1184-1202.
- Chantaysakorn P & Richter RL. (2000). Antimicrobial properties of pepsin-digested lactoferrin added to carrot juice and filtrates of carrot juice. *Journal of Food Protection*, 63: 376-380.
- Chapple DS, Mason DJ, Joannou CL, Odell EW, Gant V & Evans RW. (1998). Structure-functions relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. *Infection and Immunity*, 66: 2434-2440.
- Cheah PB & Ledward DA. (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Science*, 43: 123-134.
- Cheah PB & Ledward DA. (1997). Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. *Journal of Food Science*, 62: 1135-1138.
- Cheftel JC. (1991). High pressure applications in food technology. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 108: 141-153.
- Cheftel JC. (1992). Effect of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. En: *High Pressure and Biotechnology*. Balny C, Hayashi R, Heremans K & Masson P (eds). Editions John Libbey Eurotext, Montrouge. Pp. 195-209.
- Cheftel JC. (1995). High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*, 1: 75-90.
- Cheftel JC & Culioli J. (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 46: 211-236.
- Chen HQ, Hoover DG & Kingsley DH. (2005). Temperature and treatment time influence high hydrostatic pressure inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Journal of Food Protection*, 68: 2389-2394.
- Chen H, Guan D & Hoover DG. (2006). Sensitivities of foodborne pathogens to pressure changes. *Journal of Food Protection*, 69: 130-136.
- Chierici R. (2001). Antimicrobial actions of lactoferrin. *Advances in Nutritional Research*, 10: 247-269.
- Chilton P, Isaacs NS, Mackey B & Stenning R. (1997). The effects of high hydrostatic pressure on bacteria. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*. Heremans K (ed). Leuven University Press, Belgium. pp. 225-228.
- Chimura T, Hirayama T & Nakabara M. (1993). In vitro antimicrobial activities of lactoferrin, its concomitant use with cefpodoxime proxetil and clinical effect of cefpodoxime proxetil. *The Japanese Journal of Antibiotics*, 46: 482-485.
- Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, Nes IF & Hernández PE. (2001) Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, 7: 281-305.

- Cintra WM, Silva-Filho FC & De Souza W. (1986). The surface charge of *Toxoplasma gondii*: a cytochemical and electrophoretic study. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 18: 773-781.
- Cioni P & Strambini GB. (1996). Pressure effects on the structure of oligomeric proteins prior to subunit dissociation. *Journal of Molecular Biology*, 263: 789-799.
- Cirioni O, Giacometti A, Barchiesi F & Scalise G. (2000). Inhibition of growth of *Pneumocystis carinii* by lactoferrins alone and in combination with pyrimethamine, clarithromycin and minocycline. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 577-582.
- Cleary TG, Mathewson JJ, Faris E & Pickering LK. (1985). Shiga-like cytotoxin production by enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. *Infection and Immunity*, 47: 335-337.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF & Chikindas ML. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1-20.
- Clouston JG & Wills PA. (1969). Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumillus* spores by high hydrostatic pressure. *Journal of Bacteriology*, 97: 684-690.
- CNE. (2005). Resultados de la declaración al Sistema de Información Microbiológica. *Boletín Epidemiológico Semanal*, 13: 265-276.
- Cohen MS, Mao J, Rasmussen GT, Serody JS & Britigan BE. (1992). Interaction of lactoferrin and lipopolysaccharide (LPS): effects on the antioxidant property of lactoferrin and the ability of LPS to prime human neutrophils for enhanced superoxide formation. *Journal of Infectious Diseases*, 166: 1375-1378.
- Colomb E, Estevenon JP, Figarella C, Guy O & Sarles H. (1974). Characterization of an additional protein in pancreatic juice of men with chronic calcifying pancreatitis: identification to lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 342: 306-312.
- Conesa C, Calvo M & Sánchez L. (2010). Recombinant human lactoferrin: a valuable protein for pharmaceutical products and functional foods. *Biotechnology Advances*, 28: 831-838.
- Considine KM, Kelly AL, Fitzgerald GF, Hill C & Sleator RD. (2008). High pressure processing-effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters*, 281: 1-9.
- Conneely OM. (2001). Antiinflammatory activities of lactoferrin. *Journal of the American College of Nutrition*, 20: 389S-395S.
- Coppa GV, Zampini L, Galeazzi T & Gabrielli O. (2006). Prebiotics in human milk: a review. *Digestive and Liver Disease*, 38: S291-S294.
- Cornish J, Callon KE, Naot D, Palmano KP, Banovic T, Bava U, Watson M, Lin JM, Tong PC, Chen Q, Chan VA, Reid HE, Fazzalari N, Baker HM, Baker EN, Haggarty NW,

- Grey AB & Reid IR . (2004). Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology*, 145: 4366-4374
- Cornish J, Palmano K, Callon KE, Watson M, Lin JM, Valenti P, Naot D, Grey AB & Reid IR. (2006). Lactoferrin and bone; structure-activity relationships. *Biochemistry and Cell Biology*, 84: 297-302.
- Cousin MA. (1982). Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection*, 45: 172-207.
- Cox TM , Mazurier J, Spik G, Montreuil J & Peters TJ. (1979). Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. *Biochimica Biophysica Acta*, 588: 120-128.
- Crichton RR. (1990). Proteins of iron storage and transport. *Advances in Protein Chemistry*, 40: 281-363.
- Cross HR. (1986). Características organolépticas de la carne. Parte 1- Factores sensoriales y evaluación. En: Price JF & Schweigert BS (eds). *La Ciencia de la carne y los productos cárnicos*. Acribia, Zaragoza.
- Dainty RH & Hibbard CM. (1980). Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. *Journal of Applied Bacteriology*, 48: 387-396.
- Dalmastri C, Valenti P, Visca P, Vittorioso P & Orsi N. (1988). Enhanced antimicrobial activity of lactoferrin by binding to the bacterial surface. *Microbiologica*, 11: 225-230.
- Damiens E, El Yazidi I, Mazurier J, Duthille I, Spik G & Boilly-Marier Y. (1999). Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 74: 486-498.
- Daoudi L. (2004). Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre el gazpacho y zumo de uva. Tesis doctoral, C.E.R, Planta de Tecnología de Alimentos, UAB.
- Davidson LA & Lönnerdal B. (1988). Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane: ontogeny and effect of glycan chain. *American Journal of Physiology*, 254: G580-G585.
- Davidson LA & Lönnerdal B. (1989). Fe saturation and protolysis of human lactoferrin: effect on brush border receptor mediated uptake of Fe^{2+} and Mn^{2+} . *American Journal of Physiology*, 257: G930-G934.
- Davidson LA, Litov RE & Lönnerdal B. (1990). Iron retention from lactoferrin-supplemented formulas in infant rhesus monkeys. *Pediatric Research*, 27: 170-180.
- De Lillo A, Teanpaisan R, Fierro JF & Douglas C. (1996). Binding and degradation of lactoferrin by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 14: 135-143.

- De Lillo A, Quiros LM & Fierro JF. (1997). Relationship between antibacterial activity and cell surface binding of lactoferrin in species of genus *Micrococcus*. FEMS Microbiology Letters, 150: 89-94.
- De Vet BJ & Van Vugt H. (1971). Lactoferrin, in particular the relation with iron absorption. Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde, 115: 961-967.
- De Vuyst L & Leroy F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 13: 194-199.
- Debbabi H, Dubarry M, Rautureau M & Tomé D. (1998). Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice. Journal of Dairy Research, 65: 283-293.
- Dehecchi MC, Tamanini A, Bonizzato A & Cabrini G. (2000). Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. Virology, 268: 382-390.
- Deuchi T & Hayashi R. (1992). High pressure treatments at subzero temperature: applications to preservation, rapid freezing and rapid thawing of foods. En: High Pressure and Biotechnology. Balny C, Hayashi R, Heremans K & Masson P (eds). Editions John Libbey Eurotext Ltd, Montrouge, Francia. pp. 261-267.
- Devi AS, Das MR & Pandit MW. (1994). Lactoferrin contains structural motifs of ribonuclease. Biochimica et Biophysica Acta, 1205: 275-281.
- Dhaenens L, Szczebara F & Husson MO. (1997). Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from *Helicobacter pylori*. Infection and Immunity, 65: 514-518.
- Di Biase AM, Pietrantonio A, Tinari A, Siciliano R, Valenti P, Antonini G, Seganti L & Superti F. (2003). Heparin-interacting sites of bovine lactoferrin are involved in anti-adenovirus activity. Journal of Medical Virology, 69: 495-502.
- Di Biase AM, Tinari A, Pietrantonio A, Antonini G, Valenti P, Conte MP & Superti F. (2004). Effect of bovine lactoferrin on enteropathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in Hep-2 cells. Journal of Medical Microbiology, 53: 407-412.
- Di Mario F, Aragona G, Dal Bo N, Cavestro GM, Cavallaro L, Iori V, Comparato G, Leandro G, Pilotto A & Franzè A. (2003). Use of bovine lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication. Digestive and Liver Disease, 35: 706-710.
- Dial EJ, Romero JJ, Headon DR & Lichtenberger LM. (2000). Recombinant human lactoferrin is effective in the treatment of *Helicobacter felis*-infected mice. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 52: 1541-1546.
- Dial EJ & Lichtenberger LM. (2002). Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis. Biochemistry and Cell Biology, 80: 113-117.

- Diarra MS, Petitclerc D, Deschenes E, Lessard N, Grondin G, Talbot BG & Lacasse P. (2003). Lactoferrin against *Staphylococcus aureus* mastitis. Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 95: 33-42.
- Díaz-Cinco M & Martinelli S. (1991). The use of microvaves in sterilization. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 11: 722-724.
- Diehl P, Schauwecker J, Mittelmeier W & Schmitt M. (2008). High hydrostatic pressure, a novel approach in orthopedic surgical oncology to disinfect bone, tendons and cartilage. *Anticancer Research*, 28: 3877-3883.
- Dijkshoorn L, Brouwer CP, Bogaards SJ, Nemec A, Van den Broek PJ & Nibbering PH. (2004). The synthetic N-terminal peptide of human lactoferrin, hLF(1-11) is highly effective against experimental infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 4919-4921.
- Dionysius DA & Milne JM. (1997). Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *Journal of Dairy Science*, 80: 667-674.
- Drago-Serrano ME. (2007). Lactoferrina: producción industrial y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38: 30-38.
- Drago-Serrano ME, Flores-Romo L, Oliver-Aguillón G, Jarillo-Luna RA, Reina-Garfias H, Barbosa-Cabrera E & Campos-Rodríguez R. (2008). La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria. *Bioquímica*, 33: 71-82.
- Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM & Prévost H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 564-582.
- Drobniewski FA. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, 6: 324-338.
- Du Y, Lin L, Schmidt M, Bøgh IB, Kragh PM, Sørensen CB, Li J, Purup S, Pribenszky C, Molnár M, Kuwayama M, Zhang X, Yang H, Bulund L & Vajta G. (2008). High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. *Cloning and Stem Cells*. 10: 325-330.
- Duarte DC, Nicolau A, Teixeira JA & Rodrigues LR. (2010). The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines. *Journal of Dairy Science*, 94: 66-76.
- Duchesne P, Grenier D & Mayrand D. (1999). Binding and utilization of human transferrin by *Prevotella nigrescens*. *Infection and Immunity*, 67: 576-580.
- Dumay EM, Kalichevsky MT & Cheftel JC. (1998). Characteristics of pressure-induced gels of β -lactoglobulin at various times after pressure release. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 31: 10-19.

- Dupont D, Arnould C, Rolet-Repecaud O, Duboz G, Faurie F, Martin B & Beuvier E. (2006). Determination of bovine lactoferrin concentrations in cheese with specific monoclonal antibodies. *International Dairy Journal*, 16: 1081-1087.
- Dwivedi BK. (1975). Meat flavor. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 5: 487-535.
- Dziadek B, Dzitko K & Dlugonska H. (2005). *Toxoplasma gondii* binds human lactoferrin but not transferrin. *Experimental Parasitology*, 110: 165-167.
- Earnshaw RG. (1995). Kinetics of high pressure inactivation of microorganisms. En: *High Pressure Processing of Foods*. Ledward LA, Johnston DE, Earnshaw RG & Hasting APM (eds). *Mottinghamsm University Prss, Leicestershire, UK*. pp. 37-46.
- Earnshaw RG. (1996). High pressure food processing. *Nutrition and Food Science*, 2: 8-11.
- EC nº 258/97. Regulation of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel ingredients. *Official Journal L043*.
- Edal J & Sabbioni E. (1989). Vanadium transport across placenta and milk of rats to the fetus and newborn. *Biological Trace Element Research*, 22: 265-275
- Edde L, Hipolito RB, Hwang FAY, Headon DR, Shalwitz RA & Sherman MP. (2001). Lactoferrin protects neonatal rats from gut-related systemic infection. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281: G1140-G1150.
- EFSA. (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 2011: 9(3):2090. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- EIC. (2001). Generally recognized as safe (GRAS) notification for bovine lactoferrin as a component of a spray to prevent microbial contamination of beef products. *Environmental International Corporation*. Arlington, Virginia
- Elass-Rochard E, Roseanu A, Legrand D, Trif M, Salmon V, Motas C, Monteruil J & Spik G. (1995). Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055BS lipopolysaccharide. *The Biochemical Journal*, 312: 839-845.
- Elliot JI, Senft B, Erhardt G & Fraser D. (1984). Isolation of lactoferrin and its concentration in sows' colostrum and milk during a 21-day lactation. *Journal of Animal Science*, 59: 1080-1084.
- Ellison RT III, Giehl TJ & LaForce FM. (1988). Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infection and Immunity*, 56: 2774-2781.
- Ellison RT III, LaForce FM, Giehl TJ, Boose DS & Dunn BE. (1990). Lactoferrin and transferrin damage of the Gram-negative outer membrane is modulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} . *Journal of General Microbiology*, 136: 1437-1446.
- Ellison RT III. (1994). The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 357: 71-90.

- Ennahar S, Aoude-Werner D, Sorokine O, Van Dorsselaer A, Bringel F, Hubert JC & Hasselmann C. (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4381-4387.
- Eppert I, Valdes-Stauber N, Gotz H, Busse M & Scherer S. (1997). Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium* lines as evaluated in situ on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4812-4817.
- Erdei J, Forsgren A & Naidu AS. (1994). Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 62: 1236-1240.
- Ewing WH & Fife MA. (1968). *Enterobacter hafniae*: the *Hafnia* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 18: 263-271.
- Faber C, Stallmann HP, Lyarun DM, Joosten U, von Eiff C, Van Nieuw Amerongen A & Wuisman PI. (2005). Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 2438-2444.
- Facon MJ & Skura BJ. (1996). Antibacterial activity of lactoferricin, lysozyme and EDTA against *Salmonella enteritidis*. *International Dairy Journal*, 6: 303-313.
- Fairweather-Tait SJ, Balmer SE, Scott PH & Minski MJ. (1987). Lactoferrin and iron absorption in newborn infants. *Pediatric Research*, 22: 651-654.
- Fang W & Oliver SP. (1999). Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiology Letters*, 176: 91-96.
- FAO/WHO. (1993). The role safety in health and development. Report of the joint expert committee on food safety, Geneva: World Health Organization.
- Farr D. (1990). High pressure technology in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 1: 14-16.
- FDA. (2009). Food Code. U.S. Public Health Service.
- FDA/CFSAN. (2001). Agency response letter GRAS notice No. GRN 000067.
- Fernandes PM, Farina M & Kurtenbach E. (2001). Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in Applied Microbiology*, 32:42-46.
- Fleet JC. (1995). A new role for lactoferrin: DNA binding and transcription activation. *Nutrition Reviews*, 53: 226-227.
- Flores-Villaseñor H, Canizalez-Román A, Reyes-López M, Nazmi K, de la Garza M, Zazueta-Beltrán J, León-Sicairos N & Bolscher JGM. (2010). Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFc_{in}, LFamp_{in} and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biomaterials*, 23: 569-578.

- Foegeding PM, Thomas AB, Pilkington DH & Klaenhammer TR. (1992). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in-situ produced pediocin during dry fermented sausage production. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 884-890.
- Foguel D & Weber G. (1995). Pressure-induced dissociation and denaturation of allophycocyanin at subzero temperatures. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 28759-28766.
- Forrest JC, Aberle ED, Hedrick HB, Judge MD & Merkel RA. (1975). *Principles of Meat Science*. WH Freeman and Company, San Francisco, USA.
- Foster LA & Dyer DW. (1993). A siderophore production mutant of *Bordetella bronchiseptica* cannot use lactoferrin as an iron source. *Infection and Immunity*, 61: 2698-2702.
- Fowler CE, Soothill JS & Oakes L. (1997). MICs of rifampicin and chloramphenicol for mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains are lower when human lactoferrin is present. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40: 877-879.
- Franco I, Castillo E, Pérez MD, Calvo M & Sánchez L. (2010). Effect of bovine lactoferrin addition to milk in yogurt manufacturing. *Journal of Dairy Science*, 93: 4480-4489.
- Fransson GB, Keen CL & Lonnerdal B. (1983a). Supplementation of milk with iron bound to lactoferrin using weanling mice: effects on hematology and tissue iron. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2: 693-700.
- Fransson GB, Thoren-Tolling K, Jones B, Hambræus L & Lönnerdal B. (1983b). Absorption of lactoferrin iron in suckling pigs. *Nutrition Research*, 3: 373-384.
- Fritsch G, Sawatzki G, Treumer J, Jung A & Spira DT. (1987). *Plasmodium falciparum* inhibition in vitro with lactoferrin, desferrithiocin, and desferricrocin. *Experimental Parasitology*, 63: 1-9.
- FSIS/USDA. (2000). 9 CFR Part 424: Food additives for use in meat and poultry products: sodium diacetate, sodium acetate, sodium lactate and potassium lactate. *Federal Register* 65, 3121-3123.
- Fujihara T & Hayashi K. (1995). Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type-1 (HSV-1) infection to mouse cornea. *Archives of Virology*, 140: 1469-1472.
- Fujita K, Matsuda E, Sekine K, Iigo M & Tsuda H. (2004a). Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats. *Carcinogenesis*, 25: 1961-1966.
- Fujita K, Matsuda E, Sekine K, Iigo M & Tsuda H. (2004b). Lactoferrin modifies apoptosis-related gene expression in the colon of the azoxymethane-treated rats. *Cancer Letters*, 213: 21-29.
- Funtenberger S, Dumay E & Cheftel JC. (1995). Pressure aggregation of β -lactoglobulin isolate in different pH 7 buffers. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28: 410-418.

- Furmanski P, Li ZP, Fortuna MB, Swamy CV & Das MR. (1989). Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity. *Journal of Experimental Medicine*, 170: 415-429.
- Gado I, Erdei J, Laszlo VG, Paszti J, Czirok E, Kontrohr T, T'oth I, Forsgren A & Naidu AS. (1991). Correlation between human lactoferrin binding and colicin susceptibility in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35: 2538-2543.
- Garcia CR, Amaral A, Abrahamsohn P & Verjovski-Almeida S. (1992). Dissociation of F-actin induced by hydrostatic pressure. *European Journal of Biochemistry*, 209: 1005-1011.
- Garriga M, Aymerich MT & Hugas M. (2002). Tecnologías emergentes en la conservación de productos cárnicos: altas presiones hidrostáticas en jamón cocido loncheado. *Eurocarne*, 104: 77-84.
- Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzeby J & Tindall BJ. (2007). The taxonomic outline of Bacteria and Archaea, Release 7.7. Disponible en: <http://www.taxonomicoutline.org>
- Gaspar LP, Silva AC, Gomes AM, Freitas MS, no Bom AP, Schwarcz WD, Mestecky J, Novak MJ, Foguel D & Silva JL. (2002). Hydrostatic pressure induces the fusion-active state of enveloped viruses. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 8433-8439.
- Gekko K & Koga S. (1983). The effect of pressure on thermal-stability and *in vitro* fibril formation of collagen. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47: 1027-1033.
- Gervilla R, Ferragut V & Guamis B. (2000). High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *Journal of Dairy Science*, 83: 674-682.
- Ghafouri B, Ståhlbom B, Tagesson C & Lindahl M. (2002). Newly identified proteins in human nasal lavage fluid from non-smokers and smokers using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics*, 2: 112-120.
- Gifford JL, Hunter HN & Vogel HJ. (2005). Lactoferricin: a lactoferrin derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 2588-2598.
- Gill CO & Newton KG. (1977). The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 43: 189-195.
- Gill CO. (1979). Intrinsic bacteria in meat. *Journal of Applied Bacteriology*, 47: 367-378.
- Gill CO. (1982). Microbial interactions with meat. En: *Meat Microbiology*. Brown MD (ed). Applied Science Publishers, London. pp. 225-264.
- Gill CO. (1986). The microbiology of chilled meat storage. *Proceedings of the 24th Meat Industry Research Conference*, Hamilton, New Zealand, MIRINZ publication 852; 210-213

- Gill CO. (1996). Extending the storage life of raw chilled meats. *Meat Science*, 43S: S99-S109.
- Gillin FD, Reiner DS & Wang CS. (1983). Killing of *Giardia lamblia* trophozoites by normal human milk. *Journal of Cellular Biochemistry*, 23: 47-56.
- Goldman AS, Garza C, Johnson CA, Nichols BL & Goldblum RM. (1982). Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. *The Journal of Pediatrics*, 100: 563-567
- Gomes MRA, Clark DC & Ledward DA. (1998). Effects of high pressure on amylases and starch in wheat and barley flours. *Food Chemistry*, 63: 363-372.
- Gomez HF, Herrera-Insua I, Siddiqui MM, Diaz-Gonzalez VA, Caceres E, Newburg DS & Cleary TG. (2001). Protective role of human lactoferrin against invasion of *Shigella flexneri* M90T. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, S01: 457-467.
- Gomez HF, Ochoa TJ, Herrera-Insua I, Carlin LG & Cleary Tg. (2002). Lactoferrin protects rabbits from *Shigella flexneri*-induced inflammatory enteritis. *Infection and Immunity*, 70: 7050-7053.
- Gomez HF, Ochoa TJ, Carlin LG & Cleary TG. (2003). Human lactoferrin impairs virulence of *Shigella flexneri*. *The Journal of Infectious Diseases*, 187: 87-95.
- González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S & Rascón-Cruz Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 301.e1-301.e8.
- Gould GW & Sale JH. (1970). Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. *Journal of General Microbiology*, 60: 335-346.
- Grab DJ, Lonsdale-Eccles JD, Oh MW & Corbeil LB. (2001). Lactoferrin-binding proteins of *Trichomonas foetus*. *Journal of Parasitology*, 87: 1064-1070.
- Griffiths E & Humphreys J. (1977). Bacteriostatic effect of human milk and bovine colostrum on *Escherichia coli*: importance of bicarbonate. *Infection and Immunity*, 15: 396-401.
- Griffiths EA, Duffy L, Schanbacher L, Dryja D, Leavens A, Neiswander R, Qiao H, Dirienzo D & Ogra P. (2003). In vitro growth responses of bifidobacteria and enteropathogens to bovine and human lactoferrin. *Digestive Diseases and Sciences*, 48: 1324-1332.
- Groenink J, Walgreen-Weterings E, Van't Hof W, Veerman EC & Nieuw Amerongen AV. (1999). Cationic amphipathic peptides, derived from bovine and human lactoferrins, with antimicrobial activity against oral pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 179: 217-222.
- Gross M & Jaenicke R. (1994). Proteins under high pressure: the influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *European Journal of Biochemistry*, 221: 617-630.
- Grove SF, Forsyth S, Wan J, Coventry J, Cole M, Stewart CW, Lewis T, Ross T & Lee A. (2008). Inactivation of hepatitis A virus, poliovirus and a norovirus surrogate by high

- pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 206-210.
- Grover M, Giouzeppos O, Schnagl RD & May JT. (1997). Effect of human milk prostaglandins and lactoferrin on respiratory syncytial virus and rotavirus. *Acta Paediatrica*, 86: 315-316.
- Guan D, Kniel K, Calci KR, Hicks DT, Pivarnik LF & Hoover DG. (2006). Response of four types of coliphages to high hydrostatic pressure. *Food Microbiology*, 23: 546-551.
- Hamid MAK, Boulanger RJ, Tong SC, Gallop RA & Pereira RR. (1969). Microwave pasteurization of raw milk. *The Journal of Microwave Power*, 4: 272-274.
- Hancock REW & Scott MG. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 8856-8861.
- Hangoc G, Lu L, Oliff A, Gillis S, Hu W, Bicknell DC, Williams D & Broxmeyer HE. (1987). Modulation of Friend virus infectivity in vivo by administration of purified preparations of human lactoferrin and recombinant murine interleukin-3 to mice. *Leukemia*, 1: 762-764.
- Hara K, Ikeda M, Saito S, Matsumoto S, Numata K, Kato N, Tanaka K & Sekihara H. (2002). Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes. *Hepatology Research*, 24: 228-236.
- Harmsen MS, Swart PJ, de Bethune MP, Pauwels R, De Clercq E, The TH & Meijer DK. (1995). Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *The Journal of Infectious Diseases*, 172: 380-388.
- Harvey E & Loomis A. (1929). The destruction of luminous bacteria by high frequency sound waves. *Journal of Bacteriology*, 17: 314-318.
- Hasegawa K, Motsuchi W, Tanaka S & Dosako S. (1994). Inhibition with lactoferrin on in vitro infection with human herpes virus. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 47: 73-85.
- Hauben KJA, Bartlett DH, Soontjens CCF, Cornelis K, Wuytack EY & Michiels CW. (1997). *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 945-950.
- Hauben KJA, Bernaets K & Michiels CW. (1998). Protective effect of calcium on inactivation on *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 678-684.
- Haug BE, Strøm MB & Svendsen JSM. (2007). The medicinal chemistry of short LFC-based antibacterial peptides. *Current Medicinal Chemistry*, 14: 1-18.
- Haukland HH, Ulvatne H, Sandvik K & Vorland LH. (2001). The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. *FEBS Letters*, 508: 389-393.

- Håversen LA, Engberg I, Baltzer L, Dolphin G, Hanson LA & Mattsby-Baltzer I. (2000). Human lactoferrin and peptides derived from a surface-exposed helical region reduce experimental *Escherichia coli* urinary tract infection in mice. *Infection and Immunity*, 68: 5816-5823.
- Håversen LA, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA & Mattsby-Baltzer I. (2002). Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cellular Immunology*, 220: 83-95.
- Hayakawa I, Kanno T, Yoshiyama K & Fujio Y. (1994). Oscillatory compared with continuous high pressure sterilization on *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Food Science*, 59: 164-167.
- Hayashi R & Hayashida A. (1989). Increased amylase digestibility of pressure-treated starch. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 2543-2544.
- Hayashida K, Takeuchi T, Shimizu H, Ando K & Harada E. (2003). Lactoferrin enhances opioid-mediated analgesia via nitric oxide in the rat spinal cord. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285: R306-R312.
- Hayashida K, Takeuchi T & Harada E. (2004). Lactoferrin enhances peripheral opioid-mediated antinociception via nitric oxide in rats. *European Journal of Pharmacology*, 484: 175-181.
- He J & Furmanski P. (1995). Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, 373: 721-724.
- Heiszler MG, Kraft AA, Rey CR & Rust RE. (1972). Effect of time and temperature of smoking on microorganisms on frankfurters. *Journal of Food Science*, 37: 845-849.
- Hekman AM. (1971). Association of lactoferrin with other proteins, as demonstrated by changes in electrophoretic mobility. *Biochimica et Biophysica Acta*, 251: 380-387.
- Hendrickx M, Ludhikhuyze L, Van den Broeck I & Weemaes C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 197-203.
- Hendrixson DR, Qiu J, Shewry SC, Fink DL, Petty S, Baker EN, Plaut AG & St Geme JW III. (2003). Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves *Haemophilus* surface proteins at arginine-rich sites. *Molecular Microbiology*, 47: 607-617.
- Hentges DJ, Marsh WW, Petschow BW, Thal WR & Carter MK. (1992). Influence of infant diets on the ecology of the intestinal tract of human flora-associated mice. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 14: 146-152.
- Heremans K. (1985). High-pressure effects on biomolecules. En: *High Pressure Processing of Food*. Ledward DA, Johnston DE, Earnshaw RG & Hasting APM (eds). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 81-97.

- Heremans K, Van Camp J & Huyghebaert A.(1997). High-pressure effects on proteins. En: Food Proteins and their Applications. Damodaran S & Paraf A (eds). Marcel Dekker, New York. pp. 473-502.
- Herrero AM & Romero de Avila MD. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: tecnologías no térmicas. Revista de Medicina de la Universidad de Navarra, 50: 71-74.
- Hirai Y, Kawakata N, Satoh K, Ikeda Y, Hisayasu S, Orimo H & Yoshimo Y. (1990). Concentrations of lactoferrin and iron in human milk at different stages of lactation. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 36: 531-544.
- Hirano Y, Tamura M & Hayashi K. (2000). Inhibitory effect of lactoferrin on the adhesion of *Prevotella nigrescens* ATCC 25261 to hydroxyapatite. Journal of Oral Science, 42: 125-131.
- Hite BH. (1899). The effects of pressure in the preservation of milk. West Virginia Agriculture Experiment Station, Bulletin 58: 15-35.
- Hite BH, Giddins NJ & Weakly CE. (1914). The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. West Virginia Agriculture Experiment Station, Bulletin 146: 2-67.
- Hoek K, Milne JM, Grieve PA, Dionysius DA & Smith R. (1997). Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41: 54-59.
- Hoover DG, Metrick C & Farkas DF. (1989). Effects of high hydrostatic pressure on heat resistant and heat sensitive strains of *Salmonella*. Journal of Food Science, 54: 1547-1549.
- Horstein I & Wasserman A. (1986). Características organolépticas de la carne. Parte 1- Factores sensoriales y evaluación. En: Price JF & Schweigert BS (eds). La Ciencia de la carne y los productos cárnicos. Acribia, Zaragoza, España.
- Hu WL, Mazurier J, Sawatzki G, Montreuil J & Spik G. (1988). Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. Binding characteristics of membrane-bound and triton X-100-solubilized forms. Biochemical Journal, 249: 435-441.
- Huang SW, Satué-Gracia MT, Frankel EW & German JB. (1999). Effect of lactoferrin on oxidative stability of corn oil emulsions and liposomes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 1356-1361.
- Huang E, Mittal GS & Griffiths MW. (2006). Inactivation of *Salmonella enteritidis* in liquid whole egg using combination treatments of pulsed electric field, high pressure and ultrasound. Biosystems Engineering, 94: 403-413.
- Huang RQ, Ke WL, Qu YH, Zhu JH, Pei YY & Jiang C. (2007). Characterization of lactoferrin receptor in brain endothelial capillary cells and mouse brain. Journal of Biomedical Science, 1: 121-128.

- Hugas M, Garriga M & Monfort JM. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 62: 359-371.
- Huis In't Veld JHJ. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 1-18
- Hunter HN, Demcoe AR, Jenssen H, Gutteberg TJ & Vogel HJ. (2005). Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in a membrane mimetic solvent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 3387-3395.
- Huo L, Zhang K, Ling J, Peng Z, Huang X, Liu H & Gu L. (2011). Antimicrobial and DNA-binding activities of the peptide fragments of human lactoferrin and histatin 5 against *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, 56: 869-876.
- Huynh HQ, Campbell MAF, Couper RTL, Tran CD, Lawrence A & Butler RN. (2009). Lactoferrin and desferrioxamine are ineffective in the treatment of *Helicobacter pylori* infection and may enhance *H. pylori* growth and gastric inflammation in mice. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 517-522.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (2001). *Microorganismos de los alimentos*, vol. 6. *Ecología microbiana de los productos alimentarios*. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Iigo M, Kuhara T, Ushida Y, Sekine K & Moore MA. (1999). Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clinical and Experimental Metastasis*, 17: 35-40.
- Iigo M, alexander D, Long N, Xu J, Fukamachi K, Futakuchi M, Takase M & Tsuda H. (2009). Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine. *Biochimie*, 91: 86-101.
- Ikedo M, Sugiyama K, Tanaka K, Sekihara H, Shimotohno K & Kato N. (1998). Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 245: 549-553.
- Ikeuchi Y, Suzuki A, Oota T, Hagiwara K, Tatsumi R, Ito T & Balny C. (2002). Fluorescence study of the high pressure-induced denaturation of skeletal muscle actin. *European Journal of Biochemistry*, 269: 364-371.
- Ikkai T & Ooi T. (1966). The effects of pressure on F-G transformation of actin. *Biochemistry*, 5: 1551-1560.
- Ikkai T & Ooi T. (1969). The effect of pressure on actomyosin systems. *Biochemistry*, 8: 2615-2622.
- Ingram M & Dainty RH. (1971). Changes caused by microbes in spoilage of meats. *Journal of Applied Bacteriology*, 34: 21-39.
- Isamida T, Tanaka T, Omata Y, Yamauchi K, Shimazaki K & Saito A. (1998). Protective effect of lactoferricin against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 60: 241-244.

- Iwasaki T & Yamamoto K. (2002). Effect of high hydrostatic pressure on chicken myosin subfragment-1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30: 227-232.
- Iwasaki T & Yamamoto K. (2003). Changes in rabbit skeletal myosin and its subfragments under high hydrostatic pressure. *International Journal of Biological Macromolecules*, 33: 215-220.
- Jablonski LM & Bohach GA. (1997). *Staphylococcus aureus*. En: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Doyle MP, Beuchart LR & Montville TJ (eds). AMS Press. Washington DC. pp. 356-375.
- Jaenicke R. (1991). Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *European Journal of Biochemistry*, 202: 715-728.
- James SC & James C. (2002). Microbiology of refrigerated meat. En: *Meat Refrigeration*. James SC & James C (eds). CRC Press Boca Raton, Florida. pp. 3-16.
- Jarosik GP & Land CB. (2000). Identification of a human lactoferrin-binding protein in *Gardnerella vaginalis*. *Infection and Immunity*, 68: 3443-3447.
- Jennison AV & Verma NK. (2004). *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 43-58.
- Jenssen H, Hamill P & Hancock RE. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 491-511.
- Jenssen H & Hancock REW. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, 91: 19-29.
- Johansson BG. (1960). Isolation of an iron containing red protein from human milk. *Acta Chemica Scandinavica*, 14: 510-512.
- Jonasch E, Stadler WM, Bukowski RM, Hayes TG, Varadhachary A, Malik R, Figlin RA & Srinivas S. (2008). Phase 2 trial of talactoferrin in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*, 113: 72-77.
- Jones EM, Smart A, Bloomberg G, Burgess L & Millar MR. (1994). Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 208-214.
- Kakuta I. (1998). Reduction of stress response in carp, *Cyprinus carpio* L., held under deteriorating environmental conditions by oral administration of bovine lactoferrin. *Journal of Fish Diseases*, 21: 161-167.
- Kalchayanand N, Sikes T, Dunne CP & Ray B. (1998a). Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiology*, 15: 207-214.
- Kalchayanand N, Sikes T, Dunne CP & Ray B. (1998b). Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*, 61: 425-431.
- Kalichevsky MT, Knorr D & Lillford PJ. (1995). Potential applications of high-pressure effects on ice-water transition. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 253-259.

- Kalmar JR & Arnold RR. (1988). Killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by human lactoferrin. *Infection and Immunity*, 56: 2552-2557.
- Kanyshkova TG, Semenov DV, Buneva VN & Nevinsky GA. (1999). Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities. *FEBS Letters*, 451: 235-237.
- Kanyshkova TG, Buneva VN & Navinsky GA. (2001). Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry (Moscow)*, 56: 1-7.
- Kanyshkova TG, Babina SE, Semenov DV, Isaeva N, Vlassor AV, Neutroev KN, Kul'minskaya AA, Buneva VN & Nevinsky GA. (2003). Multiple enzymatic activities of human milk lactoferrin. *European Journal of Biochemistry*, 270: 3353-3361.
- Karthikeyan S, Sharma S, Sharma AK, Paramasivam M, Yadav S, Srinivasan A & Singh TP. (1999). Structural variability and functional convergence in lactoferrins. *Current Science*, 77: 241-255.
- Kato M & Hayashi R. (1999). Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63: 1321-1328.
- Katunuma N, Le QT, Murata E, Matsui A, Majima E, Ishimaru N, Hayashi Y & Ohashi A. (2006). A novel apoptosis cascade mediated by lysosomal lactoferrin and its participation in hepatocyte apoptosis induced by D-galactosamine. *FEBS Letters*, 580: 3699-3705.
- Kawakami H, Hiratsuka M & Dosako S. (1988). Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52: 903-908.
- Kawakami H, Dosako S & Nakajima I. (1993). Effect of lactoferrin on iron solubility under neutral conditions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57: 1376-1377.
- Kawasaki Y, Isoda H, Shinmoto H, Tanimoto M, Dosako S, Idota T & Nakajima I. (1993). Inhibition by kappa-casein glycomacropeptide and lactoferrin of influenza virus hemagglutination. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57: 1214-1215.
- Kawasaki Y, Tazume S, Shimizu K, Matsuzawa H, Dosako S, Isoda H, Tsukiji M, Fujimura R, Muranaka Y & Isihida H. (2000). Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to host cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64: 348-354.
- Kijlstra A, Jeurissen SH & Koning KM. (1983). Lactoferrin levels in normal human tears. *The British Journal of Ophthalmology*, 67: 199-202.
- Kim WS, Ohashi M, Tanaka T, Kumura H, Kim GY, Kwon IK, Goh JS & Shimazaki K. (2004). Growth-promoting effects of lactoferrin on *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Biometals*, 17: 279-283.
- Kim CW, Son KN, Choi SY & Kim J. (2006). Human lactoferrin upregulates expression of KDR/Flk-1 and stimulates VEGF-A-mediated endothelial cell proliferation and migration. *FEBS Letters*, 580: 4332-4336.

- Kim WS, Rahman MM & Shimazaki KI. (2008). Antibacterial activity and binding ability of bovine lactoferrin against *Pseudomonas* spp. *Journal of Food Safety*, 28: 23-33.
- Kim J, Ko Y, Park YK, Kim NI, Ha WK & Cho Y. (2010). Dietary effect of lactoferrin-enriched fermented milk on skin surface lipid and clinical improvement of acne vulgaris. *Nutrition*, 26: 902-909.
- Kingsley DH, Hoover DG, Papafragkou E & Richards GP. (2002). Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 65: 1605-1609.
- Kingsley DH, Chen HQ & Hoover DG. (2004). Inactivation of selected picornaviruses by high hydrostatic pressure. *Virus Research*, 102: 221-224.
- Kingsley DH, Guan DS & Hoover DG. (2005). Pressure inactivation of hepatitis A virus in strawberry puree and sliced green onions. *Journal of Food Protection*, 68: 1748-1751.
- Kingsley DH, Hollinian DR, Calci KR, Chen HQ & Flick GJ. (2007). Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 581-585.
- Kishore AR, Erdei J, Naidu SS, Falsen E, Forsgren A & Naidu AS. (1991). Specific binding of lactoferrin to *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 67: 115-119.
- Klebanoff SJ & Waltersdorff AM. (1990). Prooxidant activity of transferrin and lactoferrin. *Journal of Experimental Medicine*, 172: 1293-1303.
- Konuspayeva G, Faye B, Loiseau G & Levieux D. (2007). Lactoferrin and immunoglobulin contents in camel's milk (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*, and hybrids) from Kazakhstan. *Journal of Dairy Science*, 90: 38-46.
- Korhonen H & Marnila P. (2002). Milk proteins: Lactoferrin. In: *Encyclopaedia of Dairy Sciences*. Roginski H, Fucquay J & Fox PF (eds). Elsevier Science, Academic Press, London. pp. 1946-1950.
- Korn A, Frey B, Sheriff A, Gaipf US, Franz S, Meyer-Pittroff R, Bluemelhuber G & Herrmann M. (2004). High hydrostatic pressure inactivated human tumour cells preserve their immunogenicity. *Cellular and Molecular Biology*, 50: 469-477.
- Kramer JM & Gilbert RJ. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. En: *Foodborne bacterial pathogens*. Doyle MP (ed). Marcel Dekker, New York. pp. 21-70.
- Kuhara T, Iigo M, Hoh T, Ushida Y, Sekine K, Terada N, Okamura H & Tsuda H. (2000). Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium. *Nutrition and Cancer*, 38: 192-199.
- Kuipers ME, de Vries HG, Eikenboom MC, Meijer DK & Swart PJ. (1999). Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 2635-2641.
- Kunugi S & Nomura A. (1990). Pressure as a control factor of enzymatic synthetic reactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 613: 501-505.

- Kuttila T, Pyörälä S, Saloniemi H & Kaartinen L. (2003). Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44: 35-42.
- Kuwata H, Yip TT, Tomita M & Htuchens TW. (1998). Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (LFC) from ingested lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1429: 129-141.
- Kuwata H, Yamauchi K, Teraguchi S, Ushida Y, Shimokawa Y, Toida T & Hayasawa H. (2001). Functional fragments of ingested lactoferrin are resistant to proteolytic degradation in the gastrointestinal tract of adult rats. *The Journal of Nutrition*, 131: 2121-2127.
- Labadie J.(1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science*, 52: 299-305.
- Lambert LA, Perri H & Meehan TJ. (2005). Evolution of duplications in the transferrin family of proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 140: 11-25.
- Lampreave F, Piñeiro A, Brock JH, Castillo H, Sánchez L & Calvo M. (1990). Interaction of bovine lactoferrin with other proteins of milk whey. *International Journal of Biological Macromolecules*, 12: 2-5.
- Lanier TC. (1998). High pressure processing effects on fish proteins. En: *Process-induced chemical changes in food*. Shahidi C, Ho T & Van Chuyen V (eds). Plenum Press, New York. pp. 45-55.
- Lassiter MO, Newsome AL, Sams LD & Arnold RR. (1987). Characterization of lactoferrin interaction with *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, 66: 480-485.
- Lawrie RA.(1966). The eating quality of Meat. En: *Meat Science* (4th edition). Lawrie RA (ed). Pergamon, Oxford.
- Lee HY, Park JH, Seok SH, Back MW, Kim DJ, Lee BH, Kang PD, Kim YS & Park JH. (2005). Potential antimicrobial effects of human lactoferrin against oral infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 1049-1054.
- Legrand D, Ellass E, Carpentier M & Mazurier J. (2005). Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 2549-2559.
- Legrand D, Ellass E, Carpentier M & Mazurier J. (2006). Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochemistry and Cell Biology*, 84: 282-290.
- Legrand D, Pierce A, Ellass E, Carpentier M, Mariller C & Mazurier J. (2008). Lactoferrin structure and functions. En: *Bioactive components of milk*. Bösze Z (ed). Springer, New York. pp. 163-194.
- Legrand D & Mazurier J. (2010). A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals*, 23: 365-376.
- Lehker MW & Alderete JF. (1992). Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad protein. *Molecular Microbiology*, 6: 123-132.

- Leid JG, Kerr M, Selgado C, Johnson C, Moreno G, Smith A, Shirtliff ME, O'Toole GA & Cope EK. (2009). Flagellum-mediated biofilm defense mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* against host-derived lactoferrin. *Infection and Immunity*, 77: 4559-4566.
- Leimkuhler M, Goldbeck A, Lechner MD & Witz J. (2000). Conformational changes preceding decapsidation of bromegrass mosaic virus under hydrostatic pressure: a small-angle neutron scattering study. *Journal of Molecular Biology*, 296: 1295-1305.
- Leisner JJ, Greer GG & Stiles ME. (1996). Control of beef spoilage by a sulfide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum* UAL187 during anaerobic storage at 2 °C. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2610-2614.
- Leitch EC & Willcox MDP. (1999). Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. *Journal of Medical Microbiology*, 48: 867-871
- León-Sicairos N, Reyes-López M, Ordaz-Pichardo C & de la Garza M. (2006). Microbicidal action of lactoferrin and lactoferricin and their synergistic effect with metronidazole in *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry and Cell Biology*, 84: 327-336.
- Levay PF & Viljoen M. (1995). Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, 80: 252-267
- Leveugle B, Mazurier J, Legrand D, Mazurier C, Montreuil J & Spik G. (1993). Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *European Journal of Biochemistry*, 213: 1205-1211.
- Liang GM & Jiang XP. (2010). Positive selection drives lactoferrin evolution in mammals. *Genetica*, 138: 757-762.
- Lima MF & Kierszenbaum F. (1987). Lactoferrin effects of phagocytic cell function.II. The presence of iron is required for the lactoferrin molecule to stimulate intracellular killing by macrophages but not to enhance the uptake of particles and microorganisms. *Journal of Immunology*, 139: 1647-1651.
- Ling JML & Schryvers AB. (2006). Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria. *Biochemistry and Cell Biology*, 84: 275-281.
- Longhi C, Conte MP, Seganti L, Polidoro M, Alfsen A & Valenti P. (1993). Influence of lactoferrin on the entry process of *Escherichia coli* HB101 (pRI203) in HeLa cells. *Medical Microbiology and Immunology*, 182: 25-35.
- Longhi C, Conte MP, Penta M, Cossu A, Antonini G, Superti F & Seganti L. (2004). Lactoferricin influences early events of *Listeria monocytogenes* infection in THP-1 human macrophages. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 87-91.
- Lönnerdal B. (2003). Lactoferrin. En: *Advanced Dairy Chemistry. Vol. I. Proteins*. Fox PF & McSweeney PLH (eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers. Norwell, MA. pp. 449-466.
- López-Expósito I, Pellegrini A, Amigo L & Recio I. (2008). Synergistic effect between different milk-derived peptides and proteins. *Journal of Dairy Science*, 91: 2184-2189.

- Lorget F, Clough J, Oliveira M, Daury MC, Sabokbar A & Offord E. (2002). Lactoferrin reduces in vitro osteoclast differentiation and resorbing activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296: 261-266.
- Lu L, Hangoc G, Oliff A, Chen LT, Shen RN & Broxmeyer HE. (1987). Protective influence of lactoferrin on mice infected with the polycythemia-inducing strain of Friend virus complex. *Cancer Research*, 47: 4184-4188.
- Ludwig H, Bieler C, Hallbauer K & Scigalla W. (1992). Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure. En: *High Pressure and Biotechnology*. Balny C, Hayashi R, Heremans K & Masson P (eds). John Libbey & Co., London. pp. 25-32.
- Ludwig H & Schreck Ch. (1997). The inactivation of vegetative bacteria by pressure. En: *High Pressure Research in the Bioscience and Biotechnology*. Heremans K (ed). Leuven University Press, Leuven, Bélgica. pp. 221-224.
- Lupetti A, Paulusma-Annema A, Welling MM, Dogterom-Ballering H, Brouwer CP, Senesi S, Van Dissel JT & Nibbering PH. (2003). Synergistic activity of the N-terminal peptide of human lactoferrin and fluconazole against *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 262-267.
- Macció A, Madeddu C, Gramignano G, Mulos C, Sanna E & Mantovani G. (2010). Efficacy and safety of oral lactoferrin supplementation in combination with rHuEPO- β for the treatment of anemia in advanced cancer patients undergoing chemotherapy: open-label randomized controlled study. *The Oncologist*, 15: 894-902.
- Macfarlane JJ. (1973). Pre-rigor pressurization of muscle. Effects on pH, shear value, and taste panel assessment. *Journal of Food Science*, 38: 294-298.
- Mackey BM, Forestière K & Isaacs N. (1994). The effect of high pressure on *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Letters in Applied Microbiology*, 19: 429-432.
- Mackey BM, Forestière K & Isaacs NS. (1995). Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, 9: 1-11.
- Mackey BM & Mañas P. (2008). Inactivation of *Escherichia coli* by high pressure. En: *High Pressure Microbiology*. Michiels C, Aertsew A, Bartlett D & Yayanos Y (eds). ASM Press, Washington DC. pp. 53-85.
- Mader JS, Smyth D, Marshall J & Hoskin DM. (2006). Bovine lactoferricin inhibits basic fibroblast growth factor- and vascular endothelial growth factor 165-induced angiogenesis by competing for heparin-like binding sites on endothelial cells. *American Journal of Pathology*, 169: 1753-1766.
- Majerle A, Kidrič J & Jerala R. (2003). Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 1159-1165.

- Malet A, Bournaud E, Lan A, Mikogami T, Tomé D & Blais A. (2011). Bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice via immune function modulation. *Bone*, 48: 1028-1035.
- Malinowska-Pańczyk E, Kłodziejska I & Dunajski E. (2008). Effects of high pressure on selected bacteria at subzero temperature. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58: 419-424.
- Mandava R, Fernandez I & Juillerat M. (1994). Effect of high hydrostatic pressure on sausage batters. A Proceeding of the 40th International Congress of Meat Science and Technology. La Haya, Paises Bajos.
- Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, Pugni L, Romeo MG, Messner H, Stolfi I, Decembrino L, Laforgia N, Vagnarelli F, Memo L, Bordignon L, Saia OS, Maule M, Gallo E, Mostert M, Magnani C, Quercia M, Bollani L, Pedicino R, Renzullo L, Betta P, Mosa F, Ferrari F, Magaldi R, Stronati M & Farina D. (2009). Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *Journal of the American Medical Association*, 302: 1421-1428.
- Manzoni P, Mostert M & Stronati M. (2011). Lactoferrin for prevention of neonatal infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24: 177-182.
- Marchetti M, Longhi C, Conte MP, Pisani S, Valenti P & Seganti L. (1996). Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to Vero cells. *Antiviral Research*, 29: 221-231.
- Marchetti M, Pisani S, Antonini G, Valenti P, Seganti L & Orsi N. (1998). Metal complexes of bovine lactoferrin inhibit in vitro replication of herpes simplex virus type 1 and 2. *Biometals*, 11: 89-94.
- Marchetti M, Trybala E, Superti F, Johansson M & Bergström T. (2004). Inhibition of herpes simplex virus infection by lactoferrin is dependent on interference with the virus binding to glycosaminoglycans. *Virology*, 318: 405-413.
- Marcos Muntal B. (2007). Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes. Tesis doctoral, Universidad de Gerona y Unidad de Microbiología Alimentaria, IRTA.
- Marrif HI, Alwabel NA & Mousa HM. (2009). Brain lactoferrin: an endogenous peptide or merely an intruder. *American Journal of Scientific Research*, 6: 79-85.
- Marshall DL, Andrews SL, Wells JH & Farr AJ. (1992). Influence of modified atmosphere packaga on the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 9: 303-309.
- Marshall K. (2004). Therapeutic applications of whey proteins. *Alternative Medicine Review*, 9: 136-156.

- Martín Juárez B. (2005). Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. Tesis doctoral, Departamento de Ingeniería Química Agraria y Tecnología Agroalimentaria, Universidad de Gerona.
- Martínez Izquierdo AM, Pérez Amarillo JI & Pérez Monrás MF. (2001). *Pseudomonas*. En: Microbiología y Parasitología Médicas. Llop Hernández A, Valdés-Dapena Vivanco M & Zuazo Silva L (eds). Editorial Ciencias Médicas, La Habana. pp. 304-312.
- Mason DY & Taylor CR. (1978). Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. *Journal of Clinical Pathology*, 31: 316-327.
- Masschalck B, Van Houdt R & Michiels CW. (2001). High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 325-332.
- Masson PL, Heremans JF & Dive C. (1966). An iron-binding protein common to many external secretions. *Clinica Chimica Acta* 14: 735-739
- Masson PL & Heremans JF. (1971). Lactoferrin in milk from different species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 39B: 119-129
- Massucci MT, Giansanti F, Di Nino G, Turacchio M, Giardi MF, Botti D, Ippoliti R, De Giulio B, Siciliano RA, Donnarumma G, Valenti P, Bocedi A, Polticelli F, Ascenzi P & Antonini G. 2004. Proteolytic activity of bovine lactoferrin. *Biometals*, 17: 249-255.
- Matsuda Y, Saoo K, Hosokawa K, Yamakawa K, Yokohira M, Zeng Y, Takeuchi H & Imaida K. (2007). Post-initiation chemopreventive effects of dietary bovine lactoferrin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Cancer Letters*, 246: 41-46.
- Matsue M, Tomita S, Nyui S, Matuyama J & Kiyosawa I. (1994). Suppressive effects of lactoferrin on bleomycin-dependent DNA damage by the iron ion and ascorbate. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58: 67-71.
- Matsuzaki K, Sugishita K, Fujii N & Miyajima K. (1995). Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*, 34: 3423-3429.
- Mattsby-Baltzer I, Roseanu A, Motas C, Elverfors J, Engberg I & Hanson LA. (1996). Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatric Research*, 40: 257-262.
- Mazurier J, Montreuil J & Spik G. (1985). Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 821: 453-460.
- Mbandi E & Shelef LA. (2002). Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. *International Journal of Food Microbiology*, 76: 191-198.
- McMeekin TA. (1982). Microbial spoilage of meats. En: *Developments in Food Microbiology*. Vol. 1. Davies R (ed). Applied Science Publishers, Londres, pp. 1-40.

- Metrick C, Hoover DG & Farkas DF. (1989). Effects of high hydrostatic pressure on heat resistant and heat sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, 54: 1547-1549.
- Metz-Boutigue M, Jolles J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J & Jolles P. (1984). Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry*, 145: 659-676.
- Miller CE, Rock JD, Ridley KA, Williams PH & Ketley JM. (2008). Utilization of lactoferrin-bound and transferrin-bound iron by *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 190: 1900-1911.
- Miyauchi H, Hashimoto SI, Nakajima M, Shinoda I, Fukuwatari Y & Hayasawa H. (1998). Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. *Cellular Immunology*, 187: 34-37.
- Montreuil J, Tonnelat J & Mutlet S. (1960). Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk. *Biochimica et Biophysica Acta*, 45: 413-421.
- Morales P, Calzada J, Avila M & Nuñez M. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef by single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments. *Journal of Food Protection*, 71: 811-815.
- Morales P, Calzada J, Rodriguez B, De Paz M & Nuñez M. (2009). Inactivation of *Salmonella* Enteritidis in chicken breast fillets by single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6: 577-581.
- Morild E. (1981). The theory of pressure effects on enzymes. *Advances in Protein Chemistry*, 34: 93-165.
- Morita RY. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39: 144-167.
- Moriuchi M & Moriuchi H. (2001). A milk protein lactoferrin enhances human T cell leukemia virus type 1 and suppresses HIV-1 infection. *Journal of Immunology*, 166: 4231-4236.
- Mosquito S, Ochoa TJ, Cok J & Cleary TG. (2010). Effect of bovine lactoferrin in *Salmonella* ser. Typhimurium infection in mice. *Biomaterials*, 23: 515-521.
- Mozhaev VV, Heremans K, Frank J, Masson P & Balny C. (1994). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 12: 493-501.
- Mozhaev VV, Heremans K, Frank J, Masson P & Balny C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. *Proteins*, 24: 81-91.
- Murdock CA, Cleveland J, Matthews KR & Chikindas ML. (2007). The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 255-261.
- Murphy ME, Kariwa H, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J & Takashima I. (2000). In vitro antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. *Archives of Virology*, 145: 1571-1582.

- Mussa DM, Ramaswamy HS & Smith JP. (1999). High-pressure destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* on pork. *Journal of Food Protection*, 62: 40-45.
- Naidu AS & Arnold RR. (1994). Lactoferrin interaction with *Salmonellae* potentiates antibiotic susceptibility in vitro. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 20: 69-75.
- Naidu SS, Svensson U, Kishore A & Naidu AS. (1993). Relationship between antibacterial activity and porin binding of lactoferrin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37: 240-245.
- Naidu AS. (2000). Lactoferrin: natural, multifunctional, antimicrobial. AS. Naidu (ed). CRC Press, Boca Raton.
- Naidu AS. (2001). Immobilized lactoferrin antimicrobial agents and the use thereof. US patent 6.172.040 B1.
- Naidu AS. (2002). Activated lactoferrin-A new approach to meat safety. *Food Technology*, 56: 40-45.
- Naidu AS & Nimmagudda R. (2003). Activated lactoferrin. Part 1: a novel antimicrobial formulation. *AgroFood Industry Hi-Tech*, 14: 47-50
- Naidu AS, Tulpinski J, Gustilo K, Nimmagudda R & Morgan JB. (2003). Activated lactoferrin. Part 2: Natural antimicrobial for food safety. *AgroFood Industry Hi-Tech*, 14: 27-31.
- Naidu AS, Fowler RS, Martinez C, Chen J & Tulpinski J. (2004a). Activated lactoferrin and fluconazole synergism against *Candida albicans* and *Candida glabrata* vaginal isolates. *Journal of Reproductive Medicine*, 49: 800-807.
- Naidu AS, Chen J, Martinez C, Tulpinski J, Pal BK & Fowler RS. (2004b). Activated lactoferrin's ability to inhibit *Candida* growth and block yeast adhesion to the vaginal epithelial monolayer. *Journal of Reproductive Medicine*, 49: 859-866.
- Nakagami T, Shigehisa T, Ohmori T, Taji S, Hase A, Kimura T & Yamanishi K. (1992). Inactivation of herpes viruses by high hydrostatic pressure. *Journal of Virological Methods*, 38: 255-261.
- Naot D, Grey A, Reid IR & Cornish J. (2005). Lactoferrin – a novel bone growth factor. *Clinical Medicine and Research*, 3: 93-101.
- Nascimento de Araujo A & Giugliano LG. (2000). Human milk fractions inhibit the adherence of diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) and enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) to HeLa cells. *FEMS Microbiology Letters*, 184: 91-94.
- Nascimento de Araujo A & Giugliano LG. (2001). Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *BMC Microbiology*, 1: 25-31.
- Nibbering PH, Ravensbergen E, Welling MM, Van Berkel LA, Van Berkel PH, Pauwels EK & Nuijens JH. (2001). Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infection and Immunity*, 69: 1469-1476.

- Nielsen NS, Petersen A, Meyer AS, Timm-Heinrich M & Jacobsen C. (2004). Effects of lactoferrin, phytic acid, and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7690-7699.
- Nikawa H, Samarayanake LP, Tenovno J, Pang KM & Hamada T. (1993). The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Archives of Oral Biology*, 38: 1057-1063.
- Nikawa H, Samarayanake LP & Hamada T. (1995). Modulation of the anti-*Candida* activity of apo-lactoferrin by dietary sucrose and tunicamycin in vitro. *Archives of Oral Biology*, 40: 581-584.
- Niyogi SK. (2005). Shigellosis. *The Journal of Microbiology*, 43: 133-143.
- Nonnecke BJ & Smith KL. (1984). Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk apo-lactoferrin evaluated by in vitro microassay of bacterial growth. *Journal of Dairy Science*, 67: 606-613.
- Nuñez M, Rodríguez JL, García E, Gaya P & Medina M. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 83: 671-677.
- Ochoa TJ, Noguera-Obenza M, Ebel F, Guzman CA, Gomez HF & Cleary TG. (2003). Lactoferrin impairs type III secretory system function in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 71: 5149-5155.
- Ochoa TJ & Cleary TG. (2004). Lactoferrin disruption of bacterial type III secretion systems. *Biometals*, 17: 257-260.
- Ochoa TJ, Noguera-Obenza M & Cleary TG. (2004). Lactoferrin blocks the initial host cell attachment mechanism of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 554: 463-466.
- Ochoa TJ & Cleary TG. (2009). Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie*, 91: 30-34.
- Odell EW, Sarra R, Foxworthy M, Chapple DS & Evans RW. (1996). Antibacterial activity of peptides homologous to a loop region in human lactoferrin. *FEBS Letters*, 382: 175-178.
- Oh S & Moon MJ. (2003). Inactivation of *Bacillus cereus* spores by high hydrostatic pressure at different temperatures. *Journal of Food Protection*, 66: 599-603.
- Oho T, Mitoma M & Koga T. (2002). Functional domain of bovine milk lactoferrin which inhibits the adherence of *Streptococcus mutans* cells to a salivary film. *Infection and Immunity*, 70: 5279-5282.
- Okujo N, Akiyama T, Miyoshi S, Shinoda S & Yamamoto S. (1996). Involvement of vulnibactin and exocellular protease in utilization of transferrin- and lactoferrin-bound iron by *Vibrio vulnificus*. *Microbiology and Immunology*, 40: 595-598.

- Omata Y, Satake M, Maeda R, Saito A, Shimazaki K, Yamauchi K, Uzuka Y, Tanabe S, Sarashina T & Mikami T. (2001). Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with bovine lactoferrin. The Journal of Veterinary Medical Science, 63: 187-190.
- Ono T, Murakoshi M, Suzuki N, Iida N, Ohdera M, Iigo M, Yoshida T, Sugiyama K & Nishino H. (2010). Potent anti-obesity effect of enteric-coated lactoferrin: decrease in visceral fat accumulation in Japanese men and women with abdominal obesity after 8-week administration of enteric-coated lactoferrin tablets. British Journal of Nutrition, 104: 1688-1695.
- Oram JD & Reiter D. (1968). Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. Biochimica et Biophysica Acta, 170: 351-365.
- Orsi N. (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. Biometals, 17: 189-196
- Oshima T, Ushio H & Koizumi C. (1993). High pressure processing of fish and fish products. Trends in Food Science and Technology, 4: 370-375.
- Ordóñez J, Zurera G, Bosh A, Otero A & Guamis B. (2004). Opinión del Comité Científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Dirección Ejecutiva, en relación con la aplicación de altas presiones en carne y productos cárnicos. Agencia Española de Seguridad Alimentaria. N° Referencia AESA-2003-007, aprobado por el Comité Científico el 12 de mayo de 2004.
- Otake T, Mori H, Kawahata T, Izumoto Y, Nishimura H, Oishi I, Shighisa T & Ohno H. (1997). Effect of high hydrostatic pressure treatment of HIV infectivity. En: High Pressure Research in Biosciences and Biotechnology. Heremans K (ed). Leuven University Press, Leuven, Bélgica. pp. 234-236.
- Páčová Z, Urbanová E & Durnová E. (2001). *Psychrobacter immobilis* isolated from foods: characteristics and identification. Veterinární Medicina, 46: 95-100.
- Pakdamani R, Petitjean M & El Hage Chahine JM. (1998). Transferrin. A mechanism for iron uptake by lactoferrin. European Journal of Biochemistry, 254: 144-153.
- Palou E, López Malo A, Barbosa Canovas G, Welti C & Swanson BG. (1999). Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. Journal of Food Science, 64: 42-45.
- Palou E, Lopez-Malo A, Barbosa-Canovas GV & Swanson Bg. (2007). High-pressure treatment in food preservation. En: Handbook of food preservation. Shafiur Rahman M (ed). Sultan Qaboos University, Muscat, Sultanato de Omán. pp. 815-853.
- Pan Y, Wan J, Roginski H, Lee A, Shiell B, Michalski WP & Coventry MJ. (2007a). Comparison of the effects of acylation and amidation on the antimicrobial and antiviral properties of lactoferrin. Letters in Applied Microbiology, 44: 229-234

- Pan Y, Shiell B, Wan J, Coventry MJ, Roginski H, Lee A & Michalski WP. (2007b). The molecular characterisation and antimicrobial activity of amidated bovine lactoferrin. *International Dairy Journal*, 17: 606-616.
- Pan Y, Rowney M, Guo P & Hodman P. (2007c). Biological properties of lactoferrin: an overview. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 62: 31-42.
- Park JH, Park GT, Cho IH, Sim SM, Yang JM & Lee DY. (2011). An antimicrobial protein, lactoferrin exists in the sweat: proteomic analysis of sweat. *Experimental Dermatology*, 20: 369-371.
- Pascual Anderson MR. (1989). *Microbiología Alimentaria: detección de bacterias con significado higiénico-sanitario*. Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.
- Patel HA, Singh H, Havea P, Considine T & Creamer LK. (2005). Pressure-induced unfolding and aggregation of the proteins in whey protein concentrate solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9590-9601.
- Patterson MF, Quinn M, Simpson R & Gilmour A. (1995). Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *Journal of Food Protection*, 58: 524-529.
- Patterson MF, Margey DM, Mills G, Simpson R & Gilmour A. (1997). The effect of high pressure treatment on microorganisms in foods. En: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*. Heremans K (ed). Leuven University Press, Leuven. pp. 269-272.
- Patterson MF. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1400-1409.
- Paulsson MA, Svensson U, Kishore AR & Naidu AS. (1993). Thermal behaviour of bovine lactoferrin in water and its relation to bacterial interaction and antibacterial activity. *Journal of Dairy Science*, 76: 3711-3720.
- Paulsson M, Ljungh Å & Wadström T. (1994). Inhibition of lactoferrin and vitronectin binding to *Staphylococcus aureus* by heparin. *Current Microbiology*, 29: 113-117.
- Payne KD, Davidson PM, Oliver SP & Christian GL. (1990). Influence of bovine lactoferrin on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 53: 468-472.
- Pearson AM. (1966). Desirability of beef – its characteristics and their measurement. *Journal of Animal Science*, 25: 843-851.
- Perron GG, Zasloff M & Bell G. (2006). Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proceedings of the Royal Society B*, 273: 251-256.
- Peschel A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides?. *Trends in Microbiology*, 10: 179-186.
- Petschow BW & Talbott RD. (1991). Response of *Bifidobacterium* species to growth promoters in human and cow milk. *Pediatric Research*, 29: 208-213.

- Petschow BW, Talbott RD & Batema RP. (1999). Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium* spp. in vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *Journal of Medical Microbiology*, 48: 541-549.
- Pierson MD, Collins-Thompson DL & Ordal ZJ. (1970). Microbiological sensory and pigment changes of aerobically and anaerobically packaged beef. *Food Technology*, 24: 1171-1175
- Pietrantoni A, Di Biase AM, Tinari A, Marchetti M, Valenti P, Seganti L & Superti F. (2003). Bovine lactoferrin inhibits adenovirus infection by interacting with viral structural polypeptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 2688-2691.
- Plaut AG, Qiu J, Grundy F & Wright A. (1992). Growth of *Haemophilus influenzae* in human milk: synthesis, distribution and activity of IgA protease as determined by study of iga⁺ and mutant iga⁻ cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 166: 43-52.
- Plaut AG, Qiu J & St Geme JW III. (2001). Human lactoferrin proteolytic activity: analysis of the cleaved region in the IgA protease of *Haemophilus influenzae*. *Vaccine*, 19: 148-152.
- Ponce E, Beltrán E, Sendra E, Mor-Mur M, Guamis B & Pla R. (1999a). Development of cream caramel by high hydrostatic pressure at low temperature. En: *Advances in high pressure Bioscience and Biotechnology*. Ludwig H (ed). Springer, Heidelberg. pp. 341-344.
- Ponce E, Pla R, Sendra E, Guamis B & Mor-Mur M. (1999b). Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media. *Food Microbiology*, 16: 357-365.
- Pribenszky C, Molnár M, Horváth A, Kútvölgyi G, Harnos A, Szenci O, Dengg J & Lederer J. (2007). Improved post-thaw motility, viability and fertility are achieved by hydrostatic pressure treated bull semen. *Reproduction, Fertility, and Development*, 19: 181-182.
- Pribenszky C, Du Y, Molnár M, Harnos A & Vajta G. (2008). Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Animal Reproduction Science*, 106: 200-207.
- Priest FG. (2008). *Bacillus*. En: *Biotechnology Set*. Rehm HJ & Reed G (eds). Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany. pp.368-397.
- Prusiner S. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216: 136-144.
- Puddu P, Borghi P, Gessani S, Valenti P, Belardelli F & Seganti L. (1998). Antiviral effect of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30: 1055-1062.

- Pulina MO, Sokolov AV, Zakharova ET, Kostevich VA & Vasilyer VB. (2010). Effect of lactoferrin on consequences of acute experimental hemorrhagic anemia in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 149: 219-222.
- Qin BL, Pothakamury UR, Vega H, Martín O, Barbosa-Cánovas GV & Swanson BG. (1995). Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technology*, 49: 55-60.
- Qiu J, Hendrixson DR, Baker EN, Murphy TF, St Geme JW & Plaut AG. (1998). Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenzae*. *Proceedings of the National. Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 12641-12646.
- Rainard P. (1986a). Bacteriostasis of *Escherichia coli* by bovine lactoferrin, transferrin and immunoglobulins (IgG1, IgG2, IgM) acting alone or in combination. *Veterinary Microbiology*, 11: 103-115.
- Rainard P. (1986b). Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria. *Veterinary Microbiology*, 11: 387-392.
- Ramaswamy H, Swamy CV & Das MR. (1993). Purification and characterization of a high molecular weight ribonuclease from human milk. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 4181-4187.
- Ramesh CV, Kamini NR & Puvanakrishnan R. (2004). A novel synthetic peptide derivative from lactoferrin exhibiting antimicrobial activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40: 271-275.
- Ramos-Clamont G, Rodríguez-Franco D, Guzmán-Partida AM, Acedo-Félix E & Vázquez-Moreno LV. (2010). Antibacterial activity of bovine and porcine lactoferrins against *Escherichia coli* K88+. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de LUZ*, XX: 473-479.
- Rasanayagam V, Balasubramaniam VM, Ting E, Sizer CE, Bush C & Anderson C. (2003). Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing. *Journal of Food Science*, 68: 254-259.
- Raso J, Barbosa-Cánovas G & Swanson BG. (1998). Sporulation temperature affects initiation of germination and inactivation by high hydrostatic pressure of *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 17-24.
- RD 142/2002, de 1 de febrero de 2002, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. BOE nº 44, de 20 de febrero de 2002.
- RD 348/2001, de 4 de abril de 2001, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. BOE nº 82, de 5 de abril de 2001.

- RD 379/1984, de 25 de enero de 1984. Reglamentación técnico-sanitaria de industrias, almacenes al por mayor y envasadores de productos y derivados cárnicos elaborados y de los establecimientos de comercio al por menor de la carne y productos elaborados. BOE nº 49, de 27 de febrero de 1984.
- RD 1334/1999, de 31 de Julio de 1999, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. BOE nº 202, de 24 de agosto de 1999.
- RD 2058/1982, de 12 de agosto de 1982, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. BOE nº 207, de 30 de agosto de 1982.
- RD 2484/1967, de 21 de septiembre de 1967, por el que se aprueba el texto del Código alimentario Español. BOE nº 248, de 17 de octubre de 1967.
- Reddy NR, Solomon HM, Telzloff RC, Balasubramaniam VM, Rhodehamel EJ & Ting EY. (2001). Inactivation of *Clostridium botulinum* spores by high pressure processing. Annual Report of the National Center for Food Safety and Technology, Summit-Argo, III.
- Reiter B & Oram JD. (1967). Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids. Nature, 216: 328-330.
- Reiter B, Brock JH & Steel ED. (1975). Inhibition of *Escherichia coli* by bovine colostrum and postcolostral milk II. The bacteriostatic effect of lactoferrin on a serum susceptible and serum resistant strain of *E. coli*. Immunology, 28: 83-95.
- Rey MW, Woloshuk SL, de Boer HA & Pieper FR. (1990). Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. Nucleic Acids Research, 18: 5288.
- Roberts TK & Bournsnel JC. (1975). The isolation and characterization of lactoferrin from sow milk and boar seminal plasma. Journal of Reproduction and Fertility, 42: 579-582.
- Roberts AK, Chierici R, Sawatzki G, Hill MJ, Volpato S & Vigi V. (1992). Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin: 1. Effect on the infant faecal flora. Acta Paediatrica, 81: 119-124.
- Roberts TA, Baird-Parker AC & Tompkin RB. (1996.) En: Microorganisms in food 5. Roberts TA, Baird-Parker AC & Tompkin RB (eds). Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic & Profesional, London.
- Robins-Browne RM. (1997). *Yersinia enterocolitica*. En: Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Doyle MP, Beuchart LR & Montville TJ (eds). AMS Press. Washington DC. pp. 192-215.
- Rochard E, Legrand D, Lecocq M, Hamelin R, Crepin M, Montreuil J & Spik G. (1992). Characterization of lactotransferrin receptor in epithelial cell lines from non-malignant human breast, benign mastopathies and breast carcinomas. Anticancer Research, 12: 2047-2051.

- Rodrigues L, Teixeira J, Schmitt F, Paulsson M & Månsson HL. (2009). Lactoferrin and cancer disease prevention. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49: 203-217.
- Rodríguez-Franco A, Vázquez-Moreno L & Ramos-Clamont Montfort G. (2005). Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47: 102-111
- Rogers HJ & Synge C. (1978). Bacteriostatic effect of human milk on *Escherichia coli*: the role of IgA. *Immunology*, 34: 19-28.
- Rose JE, Meyer DH & Fives-Taylor PM. (2003). Aae, an autotransporter involved in adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infection and Immunity*, 71: 2384-2393.
- Ross-Gillespie A, Gardner A, West SA & Griffin AS. (2007). Frequency dependence and cooperation: theory and a test with bacteria. *The American Naturalist*, 170: 331-342.
- Rossi P, Giansanti F, Boffi A, Ajello M, Valenti P, Chiancone E & Antonini G. (2002). Ca²⁺ binding to bovine lactoferrin enhances protein stability and influences the release of bacterial lipopolysaccharide. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 41-48.
- Rovere P. (1995). The third dimension of food technology. *Tecnologie Alimentari*, 4: 64-78.
- Roy MK, Kuwabara Y, Hara K, Watanabe Y & Tamai Y. (2002). Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. *Journal of Dairy Science*, 85: 2065-2074.
- Ruan K & Weber G. (1988). Dissociation of yeast hexokinase by hydrostatic pressure. *Biochemistry*, 27: 3295-3301.
- Ruan K & Weber G. (1989). Hysteresis and conformational drift of pressure-dissociated glyceraldehydephosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 28: 2144-2153.
- Ruan K & Weber G. (1993). Physical heterogeneity of muscle glycogen phosphorylase revealed by hydrostatic pressure dissociation. *Biochemistry*, 32: 6295-6301.
- Ruiz-Giménez P, Ibáñez A, Salom JB, Marcos JF, López-Díez JJ, Vallés S, Torregrosa G, Alborch E & Manzanares P. (2010). Antihypertensive properties of lactoferricin B-derived peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 6721-6727.
- Saito H, Miyakawa H, Tamura Y, Shimamura S & Tomita M. (1991). Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *Journal of Dairy Science*, 74: 3724-3730.
- Saito S, Takayama Y, Mizumachi K & Suzuki C. (2011). Lactoferrin promotes hyaluronan synthesis in human dermal fibroblasts. *Biotechnology Letters*, 33: 33-39.
- Sakai M, Kobayashi M & Yoshida T. (1995). Activation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, phagocytic cells by administration of bovine lactoferrin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110B: 755-759.

- Sakai T, Banno Y, Kato Y, Nozawa Y & Kawaguchi M. (2005). Pepsin-digested bovine lactoferrin induces apoptotic cell death with JNK/SAPK activation in oral cancer cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 98: 41-48.
- Salamah AA & Al-Obaidi AS. (1995a). In vivo and in vitro effects of lactoferrin on *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiologica*, 18: 267-274.
- Salamah AA & al-Obaidi AS. (1995b). Effect of some physical and chemical factors on the bactericidal activity of human lactoferrin and transferrin against *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiologica*, 18: 275-282.
- Saldo J, Sendra EY & Guamis B. (2000). High pressure for accelerating ripening of goat's milk cheese: proteolysis and texture. *Journal of Food Science*, 65: 636-640.
- Sale AJH, Gould GW & Hamilton WA. (1970). Inactivation of bacterial spores by high hydrostatic pressure. *Journal of General Microbiology*, 60: 323-334.
- Sallman FR, Baveye-Descamps S, Pattus F, Salmon V, Branza N, Spik G & Legrand D. (1999). Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human lactoferrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 16107-16114.
- Samaranayake YH, Samaranayake LP, Wu PC & So M. (1997). The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 105: 875-883.
- Sánchez L, Calvo M & Brock JH. (1992). Biological role of lactoferrin. *Archives of Disease in Childhood*. 67: 657-661.
- Sangronis E, Pothakamury U, Ramos AM & Barbosa-Cánovas GV. (1997). La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de alimentos. *Alimentaria*, 35: 33-43.
- Sato R, Inanami O, Tanaka Y, Takase M & Naito Y. (1996). Oral administration of bovine lactoferrin for treatment of intractable stomatitis in feline immunodeficiency virus (FIV)-positive and FIV-negative cats. *American Journal of Veterinary Research*, 57: 1443-1446.
- Saxelin M. (2000). Clinical documentation, product development and marketing of *Lactobacillus* GG. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 44: 102.
- Schlyter JH, Degnan AJ, Loeffelholz JM, Glass KA & Luchansky JB. (1993). Evaluation of sodium diacetate and ALTA 2341 on viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. *Journal of Food Protection*, 56: 808-810.
- Schmid G, Lüdemann HD & Jaenicke R. (1979). Dissociation and aggregation of lactic dehydrogenase by high hydrostatic pressure. *European Journal of Biochemistry*, 97: 407-413.
- Schroder G, Brandenburg K & Seydel U. (1992). Polymyxin B induces transient permeability fluctuation in an asymmetric planar lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 31: 631-638.

- Schulz-Lell G, Dörner K, Oldigs HG, Sievers E & Schaub J. (1991). Iron availability from an infant formula supplemented with bovine lactoferrin. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 80: 155-158.
- Schwaab M, Gurr A, Neumann A, Dazert S & Minovi A. (2011). Human antimicrobial proteins in ear wax. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30: 997-1004.
- Seefeldt MB, Rosendahl MS, Cleland JL & Hesterberg LK. (2009). Application of high hydrostatic pressure to dissociate aggregates and refold proteins. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10: 447-455.
- Seganti L, Di Biase AM, De Giulio B, Nicoletti M, Antonini G & Valenti P. (2001). Involvement of bovine lactoferrin moieties in the inhibition of herpes simplex virus type 1 infection. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 14: 71-79.
- Seyderhelm I, Boguslovski S, Michaelis G & Knorr D. (1996). Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *Journal of Food Science*, 61: 308-310.
- Shakibaei M & Frevert U. (1996). Dual interaction of the malaria circumsporozoite protein with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of Experimental Medicine*, 184: 1699-1711.
- Sharma M, Shearer AEH, Hoover DG, Liu MN, Solomon MB & Kniel KE. (2008). Comparison of hydrostatic and hydrodynamic pressure to inactivate foodborne viruses. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 418-422.
- Shau H, Kim A & Golub SH. (1992). Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *Journal of Leukocyte Biology*, 51: 343-349.
- Sheldon TA, Boardman GD, Flick GJ & Gallagher DL. (2008). Effect of high hydrostatic pressure processing on freely suspended and bivalve-associated T7 bacteriophage. *Journal of Food Protection*, 71: 345-350.
- Sherman MP, Bennett SH, Hwang FF & Yu C. (2004). Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and *Lactobacillus* GG. *Biometals*, 17: 285-289.
- Shigehisa T, Ohmori A, Saio S, Taji S & Hayashi R. (1991). Effects of high pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 12: 207-216.
- Shimada S, Andou M, Naito N, Yamada N, Osumi M & Hayashi R. (1993). Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40: 123-131.
- Shimamura M, Yamamoto Y, Ashino H, Oikawa T, Hazato T, Tsuda H & Iigo M. (2004). Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 111: 111-116.

- Shimazaki K, Tazume T, Uji K, Tanaka M, Kumura H, Mikawa K & Shimo-Oka T. (1998). Properties of a heparin-binding peptide derived from bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science*, 81: 2841-2849.
- Shimizu K, Matsuzawa H, Okada K, Tazume S, Dosako S, Kawasaki Y, Hashimoto K & Koga Y. (1996). Lactoferrin-mediated protection of the host from murine cytomegalovirus infection by a T-cell dependent augmentation of natural killer cell activity. *Archives of Virology*, 141: 1875-1889.
- Shin K, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H, Tomita M, Otsuka Y & Yamazaki S. (1998). Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 407-411.
- Shin K, Wakabayashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Tamura Y, Kurokawa M & Shiraki K. (2005). Effects of orally administered bovine lactoferrin and lactoperoxidase on influenza virus infection in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 717-723.
- Shin K, Wakabayashi H, Yamauchi K, Yaeshima T & Iwatsuki K. (2008). Recombinant human intelectin binds bovine lactoferrin and its peptides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31: 1605-1608.
- Shinoda I, Fukuwatari Y, Shimamura S & Tomita M. (1993). Induction of an increase in nerve growth factor content in the cell-conditioned medium of mouse L-M cells by basic peptides. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57: 835-836.
- Shinoda I, Takase M, Fukuwatari Y, Shimamura S, Koller M & Konig W. (1996). Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin 8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60: 521-523.
- Shuang GL, Rama B, Junio D, Chang-Lian PENG & Liu SD. (2003). Effect of high hydrostatic pressure treatment on physiological characteristics of rice plants (*Oryza sativa* L.). *Chinese Journal of High Pressure Physics*, 17: 122-128.
- Siciliano R, Rega B, Marchetti M, Seganti L, Antonini G & Valenti P. (1999). Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of herpes simplex virus type-1 infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264: 19-23.
- Sila DN, Duvetter T, De Roeck A, Verlent I, Smout C, Moates GK, Hills BP, Waldron KK, Hendrickx M & Van Loey A. (2008). Texture changes of processed fruits and vegetables: potential use of high-pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 309-319.
- Silva JL, Luan P, Glaser M, Voss EW & Weber G. (1992). Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *Journal of Virology*, 66: 2111-2117.
- Silva JL & Weber G. (1993). Pressure stability of proteins. *Annual Review of Physical Chemistry*, 44: 89-113.

- Simpson RK & Gilmour A. (1997a). The effect of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and model food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 83: 181-188.
- Simpson RK & Gilmour A. (1997b). The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods. *Food Microbiology*, 14: 567-573.
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP & Welsh MJ. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilms development. *Nature*, 417: 552-555
- Sinnis P, Willnow TE, Briones MR, Herz J & Nussenzweig V. (1996). Remnant lipoproteins inhibit malaria sporozoite invasion of hepatocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 184: 945-954.
- Smelt JPPM. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 152-158.
- Smiddy M, Kelly AL, Patterson MF & Hill C. (2006). High pressure-induced inactivation of Q beta coliphage and c2 phage in oysters and in culture media. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 105-110.
- Smith KL, Conrad HR & Porter RM. (1971). Lactoferrin and IgG immunoglobulins from involuted bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, 54: 1427-1435.
- Smith GC, Cross HR, Carpenter ZL, Murphey CE, Savell JW, Abraham HC & Davies GW. (1982). Relationship of USDA maturity groups to palatability of cooked beef. *Journal of Food Science*, 47: 1100-1107.
- Sørensen M & Sørensen SPL. (1939). The proteins in whey. *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg*, 23: 55-99.
- Soukka T, Lmikari M & Tenovuo J. (1991). Combined inhibitory effect of lactoferrin and lactoperoxidase system on the viability of *Streptococcus mutans*, serotype c. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 99: 390-396.
- Spadaro M, Caorsi C, Ceruti P, Varadhachary A, Forni G, Pericle F & Giovarelli M. (2008). Lactoferrin, a major defense protein of the innate immunity, is a novel maturation factor for human dendritic cells. *The FASEB Journal*, 22: 2747-2757.
- Spik G, Brunet B, Mazurierdehaine C, Fontaine G & Montreuil J. (1982). Characterization and properties of the human and bovine lactotransferrins extracted from the feces of newborn-infants. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 71: 979-985.
- Spik G, Coddeville B & Montreuil J. (1988). Comparative study of the primary structures of sero-, lacto- and ovotransferrin glycans from different species. *Biochimie*, 70: 1459-1469.
- Stallmann HP, Faber C, Bronckers AL, Nieuw Amerongen AV & Wuisman PI. (2004). Osteomyelitis prevention in rabbits using antimicrobial peptide hLF1-11- or gentamicin-containing phosphate cement. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 472-476.

- Steijns JM & Van Hooijdonk ACM. (2000). Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, 84: 11-17.
- Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H & Boman HG. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292: 246-248.
- Stiles ME. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 331-345.
- Strøm MB, Reykdal Ø & Svendsen JS. (2002). The effects of charge and lipophilicity on the antibacterial activity of undecapeptides derived from bovine lactoferricin. *Journal of Peptide Science*, 7: 36-43.
- Stuart J, Norrell S & Harrington JP. (1984). Kinetic effect of human lactoferrin on the growth of *Escherichia coli* O111. *The International Journal of Biochemistry*, 16: 1043-1047.
- Styles MF, Hoover DG & Farkas DF. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 56: 1404-1407.
- Sui Q, Roginski H, Williams RPW, Wooster TJ, Versteeg C & Wan J. (2010). Effect of the ionic strength of pulsed electric field treatment medium on the physicochemical and structural characteristics of lactoferrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 11725-11731.
- Sun XD & Holley RA. (2010). High hydrostatic pressure effects on the texture of meat and meat products. *Journal of Food Science*, 75: R17-R23.
- Superti F, Ammendolia MG, Valenti P & Seganti L. (1997). Antirotaviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Medical Microbiology and Immunology*, 186: 83-91.
- Superti F, Siciliano R, Rega B, Giansanti F, Valenti P & Antonini G. (2001). Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1528: 107-115.
- Surekha M & Reddy M. (1999). Preservatives. Classification and properties. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson RK, Batt CA & Patel PD (eds). Academic Press, Oxford, UK.
- Suslick KS. (1990). Sonochemistry. *Science*, 247: 1439-1445.
- Suzuki A, Kim K, Honma N, Ikeuchi Y & Saito M. (1992). Acceleration of meat by high pressure treatment. In: *High pressure and Biotechnology*. Balny C, Hayashi R, Heremans K & Masson P (eds). John Libbey Eurotext Ltd, Montrouge, France. pp. 219-227.
- Suzuki A. (2000). Effects of heat and high pressure treatments on antigenicity of beef. En: *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology – Progress in Biotechnology*, volume 19. Hayashi R (ed). Elsevier, Tokyo. pp. 365-374.

- Suzuki YA, Shin K & Lönnerdal B. (2001). Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry*, 40: 15771-15779.
- Suzuki YA & Lönnerdal B. (2002). Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 75-80.
- Swart PJ, Kuipers ME, Smith C, Pauwels R, De B'ethune MP, De Clercq E, Meijer DK & Huisman JG. (1996). Antiviral effects of milk proteins: acylation results in polyanionic compounds with potent activity against human immunodeficiency virus types 1 and 2 in vitro. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 12: 769-775.
- Swezey RR & Somero GN. (1985). Pressure effects on actin-self-assembly: interspecific differences in the equilibrium and kinetics of the G to F transformation. *Biochemistry*, 24: 852-860.
- Szuster-Ciesielska A, Kaminska T & Kandefer-Szerszen M. (1995). Phagocytosis-enhancing effect of lactoferrin on bovine peripheral blood monocytes in vitro and in vivo. *Archivum Veterinarium Polonicum*, 35: 63-71.
- Tachezy J, Kulda J, Bahníková I, Suchan P, Razga J & Schrevel J. (1996). *Tritrichomonas foetus*: iron acquisition from lactoferrin and transferrin. *Experimental Parasitology*, 83: 216-228.
- Tachezy J, Suchan P, Schrevel J & Kulda J. (1998). The host-protein-independent iron uptake by *Tritrichomonas foetus*. *Experimental Parasitology*, 90: 155-163.
- Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Teraguchi S, Tamura Y, Yamaguchi H & Abe S. (2003). Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 2619-2623.
- Takakura N, Wakabayashi H, Yamauchi K & Takase M. (2006). Influences of orally administered lactoferrin on IFN- γ and 12-10 production by intestinal intraepithelial lymphocytes and mesenteric lymph-node cells. *Biochemistry and Cell Biology*, 84: 363-368.
- Takeuchi T, Shimizu H, Ando K & Harada E. (2004). Bovine lactoferrin reduces plasma triacylglycerol and NEFA accompanied by decreased hepatic cholesterol and triacylglycerol contents in rodents. *British Journal of Nutrition*, 91: 533-538.
- Tanaka T, Omata Y, Saito A, Shimazaki K, Igarashi I & Suzuki N. (1996). Growth inhibitory effects of bovine lactoferrin to *Toxoplasma gondii* parasites in murine somatic cells. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 58: 61-65.
- Tanaka T, Abe Y, Inoue N, Kim WS, Kumura H, Nagasawa H, Igarashi I & Shimazaki K. (2004). The detection of bovine lactoferrin binding protein on *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 66: 619-625.
- Tang L, Cui T, Wu JJ, Liu-Mares W, Huang N & Li J. (2010). A rice-derived recombinant human lactoferrin stimulates fibroblast proliferation, migration, and sustains cell survival. *Wound Repair and Regeneration*, 18: 123-131.

- Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E & Osaki T. (2003). Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 32: 586-594.
- Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M, Seko S, Tanaka J, Uchida K, Nagashima K, Kurose T, Yamada Y, Chiba T & Seino Y. 2003. High prevalence of antibodies against carbonic anhydrase II and lactoferrin in type 1 diabetes. *Pancreas*, 27: 26-30.
- Tauscher B. 1995. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 200: 3-13.
- Taylor S, Brock J, Kruger C, Berner T & Murphy M. (2004). Safety determination for the use of bovine milk-derived lactoferrin as a component of an antimicrobial beef carcass spray. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39: 12-24.
- te Giffel MC & Beumer RR. (1999). *Bacillus cereus*: a review. *The Journal of Food Technology in Africa*, 4: 7-13.
- Teng CT. (2002). Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 7-16
- Teng CT. (2010). Lactoferrin: the path from protein to gene. *Biometals*, 23: 359-364.
- Teraguchi S, Shin K, Ozawa K, Nakamura S, Fukuwatari Y, Tsuyuki S, Namihira H & Shimamura S. (1995a). Bacteriostatic effect of orally administered bovine lactoferrin on proliferation of *Clostridium* species in the gut of mice fed bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 501-506.
- Teraguchi S, Shin K, Ogata T, Kingaku M, Kaino A, Miyauchi H, Fukuwatari Y & Shimamura S. (1995b). Orally administered bovine lactoferrin inhibits bacterial translocation in mice fed bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4131-4134.
- Teraguchi S, Wakabayashi H, Kuwata H, Yamauchi K & Tamura Y. (2004). Protection against infections by oral lactoferrin: evaluation in animal models. *Biometals*, 17: 231-234.
- Thompson AB, Bohling T, Payvandi F & Rennard SI. (1990). Lower respiratory tract lactoferrin and lysozyme arise primarily in the airways and are elevated in association with chronic bronchitis. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 115: 148-158.
- Tian SM, Ruan KC, Qian JF, Shao GQ & Balny C. (2000). Effects of hydrostatic pressure on the structure and biological activity of infectious bursal disease virus. *European Journal of Biochemistry*, 267: 4486-4494.
- Tian H, Maddox IS, Ferguson LR & Shu Q. (2010). Influence of bovine lactoferrin on selected probiotic bacteria and intestinal pathogens. *Biometals*, 23: 593-596.
- Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnell CP, Muthukumarappan K, Bourke P & Cullen PJ. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 5987-6000.

- Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H & Kawase K. (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science*, 74: 4137-4142.
- Tomita M, Takase M, Wakabayashi H & Bellamy W. (1994). Antimicrobial peptides of lactoferrin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 357: 209-218.
- Tomita M, Wakabayashi H, Yamauchi K, Teraguchi S & Hayasawa H. (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk production and applications. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 109-112.
- Tomita M, Wakabayashi H, Shin K, Yamauchi K, Yaeshima T & Iwatsuki K. (2009). Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie*, 91: 52-57.
- Toney JH & Koh ML. (2006). Inhibition of *Xylella fastidiosa* biofilm formation via metal chelators. *Journal of Laboratory Automation*, 11: 30-32.
- Trespalcios Sosa MP. (2007). Gelificación de productos avícolas por alta presión isotática: actividad sinérgica de la transglutaminasa microbiana. Tesis doctoral. CERPTA, Facultad de Veterinaria, UAB.
- Trümpler U, Straub PW & Rosenmund A. (1989). Antibacterial prophylaxis with lactoferrin in neutropenic patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8: 310-313.
- Tsuchiya T, Takeuchi T, Hayashida K, Shimuzu H, Ando K & Harada E. (2006). Milk-derived lactoferrin may block tolerance to morphina analgesia. *Brain Research*, 1068: 102-108.
- Tsuda H, Sekine K, Fujita K & Iigo M. (2002). Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanism – a review of experimental and clinical studies. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 131-136.
- Tsuda H, Kozu T, Iinuma G, Ohashi Y, Saito Y, Saito D, Akasu T, Alexander DB, Futakuchi M, Fukamachi K, Xu J, Kakizoe T & Iigo M. (2010). Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial. *Biometals*, 23: 399-409.
- Turchany JM, Aley SB & Gillin FD. (1995). Giardicidal activity of lactoferrin and N-terminal peptides. *Infection and Immunity*, 63: 4550-4552.
- Työppönen S, Petäjä E & Mattila-Sandholm T. (2003). Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 233-244.
- Ueta E, Taida T & Osaki T. (2001). A novel bovine lactoferrin peptide, FKRRWQWRM, suppresses *Candida* cell growth and activates neutrophils. *The Journal of Peptide Research*, 57: 240-249.
- Ulmer HM, Gänzle MG & Vogel RF. (2000). Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1-460. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3966-3973.

- Ulvatne H & Vorland LH. (2001). Bactericidal kinetics of 3 lactoferricins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 33: 507-511.
- Ulvatne H, Haukland HH, Olsvik Ø & Vorland LH. (2001). Lactoferricin B causes depolarization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* ATCC 25922 and fusion of negatively charged liposomes. *FEBS Letters*, 492: 62-65.
- Ulvatne H, Haukland HH, Samuelsen Ø, Krämer M & Vorland LH. (2002). Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 461-467.
- Ulvatne H, Samuelsen Ø, Houkland H, Krämer M & Vorland LH. (2004). Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 237: 377-384.
- Urrutia G, Schlüter O & Knorr D. (2004). High pressure-low temperature processing. Suggested definitions and terminology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5: 413-427.
- Valenti P, Visca P, Antonini G & Orsi N. (1986). Interaction between lactoferrin and ovotransferrin and *Candida* cells. *FEMS Microbiology Letters*, 33: 271-275.
- Valenti P, Marchetti M, Superti F, Ammendolia MG, Puddu P, Gessani S, Borghi P, Belardelli F, Antonini G & Seganti L. (1998). Antiviral activity of lactoferrin. In: *Advances in lactoferrin research*. Spik G, Legrand D, Mazurier J, Pierce A & Perraudin JP (eds). Plenum Press, New York. pp. 199-203.
- Valenti P & Antonini G. (2005). Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 2576-2587.
- Vallabhajosula S, Goldsmith SJ, Lipszyc H & Chahinian AP. (1983). 67Ga transferrin and 67Ga lactoferrin binding to tumour cells: specific versus nonspecific glycoprotein cell interaction. *European Journal of Nuclear Medicine*, 8: 354-357.
- Van Belzen N. (2002). The role of lactoferrin in cancer prevention. *Sciences des aliments*, 22: 461-465.
- Van Berkel PHC, Geerts MEJ, Van Veen HA, Kooiman PM, Pieper FR, de Boer HA & Nuijens JH. (1995). Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *Biochemical Journal*, 312: 107-114.
- Van Berkel PHC, Geerts MEJ, Van Veen HA, Mericskay M, de Boer HA & Nuijens JH. (1997). N-terminal stretch Arg², Arg³, Arg⁴ and Arg⁵ of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochemical Journal*, 328: 145-151.

- Van Camp J & Huyghebaert A. (1995). High pressure-induced gel formation of a whey protein and haemoglobin protein concentrate. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28:111-117.
- Van der Kraan MI, Groenink J, Nazmi K, Veerman EC, Bolscher JG & Nieuw Amerongen AV. (2004). Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*, 25: 177-183.
- Van der Kraan MI, Nazmi K, Teeken A, Groenink J, Van't Hof W, Veerman EC, Bolscher JG & Nieuw Amerongen AV. (2005a). Lactoferrampin, an antimicrobial peptide of bovine lactoferrin, exerts its candidicidal activity by a cluster of positively charged residues at the C-terminus in combination with a helix-facilitating N-terminal part. *Biological Chemistry*, 386: 137-142.
- Van der Kraan MI, Van Marle J, Nazmi K, Groenink J, Van't Hof W, Veerman EC, Bolscher JG & Nieuw Amerongen AV. (2005b). Ultrastructural effects on antimicrobial peptides from bovine lactoferrin on the membranes of *Candida albicans* and *Escherichia coli*. *Peptides*, 26: 1537-1542.
- Van der Strate BWA, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC & Meijer DKF. (2001). Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Research*, 52: 225-239.
- Van der Velden WJ, Van Iersel TM, Blijlevens NM & Donnelly JP. (2009). Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11). *BMC Medicine*, 7: 44.
- Van Doorne H. (2008). High-pressure treatment, a potential antimicrobial treatment for pharmaceutical preparations? A survey. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 62: 273-291.
- Van Hooijdonk ACM, Kussendrager KD & Steijns JM. (2000). In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *British Journal of Nutrition*, 84: 5127-5134.
- Van Opstal I, Vanmuysen SCM & Michiels CW. (2003). High sucrose concentration protects *Escherichia coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 1-9.
- Van Snick JL & Masson PL. (1976). The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells. *Journal of Experimental Medicine*, 144: 1568-1580.
- Van Snick JL, Markowetz B & Masson PL. (1977). The ingestion and digestion of human lactoferrin by mouse peritoneal macrophages and the transfer of its iron into ferritin. *Journal of Experimental Medicine*, 146: 817-827.
- Van Veen HA, Geerts ME, Van Berkel PH & Nuijens JH. (2004). The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *European Journal of Biochemistry*, 271: 678-684.

- Venkitanarayanan KS, Zhao T & Doyle MP. (1999). Antibacterial effect of lactoferricin B on *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Journal of Food Protection*, 62: 747-750.
- Vermeiren L, Devlieghere F, Van Beest M, de Kruijf N & Debevere J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 77-86.
- Vidal MC, Izquierdo M & Veneciana-Nogués MT. (1999). Estabilidad y métodos de conservación de los alimentos. En: Tratado de Nutrición. Hernández Rodríguez M & Sastre Gallego A (eds). Editorial Díaz de Santos, Madrid. pp. 441-464.
- Viejo-Díaz M, Andrés MT, Pérez-Gil J, Sánchez M & Fierro JF. (2003). Potassium efflux induced by a new lactoferrin-derived peptide mimicking the effect of native human lactoferrin on the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochemistry*, 68: 217-227.
- Viejo-Díaz M, Andres MT & Fierro JF. (2004). Modulation of in vitro fungicidal activity of human lactoferrin against *Candida albicans* by extracellular cation concentration and target cell metabolic activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1242-1248.
- Visca P, Berlutti F, Vittorioso P, Dalmastri C, Thaller MC & Valenti P. (1989). Growth and adsorption of *Streptococcus mutans* 6715-13 to hydroxyapatite in the presence of lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology*, 178: 69-79.
- Vogel L, Geluk F, Jansen H, Dankert J & Van Alphen L. (1997). Human lactoferrin receptor activity in non-encapsulated *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiology Letters*, 156: 165-170.
- Voldrich M, Dobias J, Ticha L, Cеровsky M & Kratka J. (2004). Resistance of vegetative cells and ascospores of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. *Journal of Food Engineering*, 61: 541-543.
- Vorland LH, Ulvatne H, Andersen J, Haukland H, Rekdal O, Svendsen JS & Gutteberg TJ. (1998). Lactoferricin of bovine origin is more active than lactoferricins of human, murine and caprine origin. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 30: 513-517.
- Vorland LH. (1999). Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica*, 107: 971-981.
- Vorland LH, Ulvatne H, Rekdal Ø & Svendsen JS. (1999a). Initial binding sites of antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 31: 467-473.
- Vorland LH, Osbakk SA, Perstolen T, Ulvatne H, Rekdal O, Svendsen JS & Gutteberg TJ. (1999b). Interference of the antimicrobial peptide lactoferricin B with the action of various antibiotics against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 31: 173-177.
- Waarts BL, Aneke OJ, Smit JM, Kimata K, Bittman R, Meijer DK & Wilschut J. (2005). Antiviral activity of human lactoferrin: inhibition of alphavirus interaction with heparan sulfate. *Virology*, 333: 284-292.

- Wada T, Aiba Y, Shimizu K, Takagi A, Miwa T & Koga Y. (1999). The therapeutic effect of bovine lactoferrin in the host infected with *Helicobacter pylori*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34: 238-243.
- Wakabayashi H, Bellamy W, Takase M & Tomita M. (1992). Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferricin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. *Journal of Food Protection*, 55: 238-240.
- Wakabayashi H, Abe S, Okutomi T, Tansho S, Kawase K & Yamaguchi H. (1996). Cooperative anti-*Candida* effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents. *Microbiology and Immunology*, 40: 821-825.
- Wakabayashi H, Matsumoto H, Hashimoto K, Teraguchi S, Takase M & Hayasawa H. (1999). Induction of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63: 955-957.
- Wakabayashi H, Uchida K, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H & Yamaguchi H. (2000). Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 595-601.
- Wakabayashi H, Teraguchi S & Tamura Y. (2002). Increased *Staphylococcus*-killing activity of an antimicrobial peptide, lactoferricin B, with minocycline and monoacylglycerol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66: 2161-2167.
- Wakabayashi H, Takakura N, Teraguchi S & Tamura Y. (2003a). Lactoferrin feeding augments peritoneal macrophage activities in mice intraperitoneally injected with inactivated *Candida albicans*. *Microbiology and Immunology*, 47: 37-43.
- Wakabayashi H, Takase M & Tomita M. (2003b). Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1277-1287.
- Wakabayashi H, Kurokawa M, Shin K, Teraguchi S, Tamura Y & Shiraki K. (2004). Oral lactoferrin prevents body weight loss and increases cytokine responses during herpes simplex virus type 1 infection of mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68: 537-544.
- Wakabayashi H, Yamauchi K & Takase M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16: 1241-1251.
- Wally J & Buchanan SK. (2007). A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. *Biometals*, 20: 249-262.
- Wang X, Hirno S, Willén R & Wadström T. (2001). Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model. *Journal of Medical Microbiology*, 50: 430-435.
- Ward PP, Paz E & Conneely OM. (2005). Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 2540-2548.

- Watanabe T, Nagura H, Watanabe K & Brown WR. (1984). The binding of human milk lactoferrin to immunoglobulin A. *FEBS Letters*, 168: 203-207.
- Weaber RA & Shelef LA. (1993). Anti-listerial activity of sodium, potassium or calcium lactate in pork liver sausage. *Journal of Food Safety*, 13: 133-146.
- Weemaes C, Ludikhuyze L, Van der Broeck I & Hendrickx M. (1989). High pressure inactivation of polyphenoloxidases. *Journal of Food Science*, 63: 873-877.
- Weinberg GA. (1994). Iron chelators as therapeutic agents against *Pneumocystis carinii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38: 997-1003.
- Weinberg ED. (2003). The therapeutic potential of lactoferrin. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 12: 841-851.
- Weinberg ED. (2007). Antibiotic properties and applications of lactoferrin. *Current Pharmaceutical Design*, 13: 801-811.
- Wiesner J & Vilcinskas A. (2010). Antimicrobial peptides. The ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 1: 440-464.
- Wilkinson N, Kurdziel AS, Langton S, Needs E & Cook N. (2001). Resistance of poliovirus to inactivation by high hydrostatic pressures. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2: 95-98.
- Willer Eda M, Lima RL & Giugliano LG. (2004). In vitro adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milk proteins. *BMC Microbiology*, 4: 18-25.
- Williams TJ, Schneider RP & Willcox MD. (2003). The effect of protein-coated contact lenses on the adhesion and viability of gram negative bacteria. *Current Eye Research*, 27: 227-235.
- Wilson ME, Vorhies RW, Andersen KA & Britigan BE. (1994). Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. *Infection and Immunity*, 62: 3262-3269.
- Wilson ME, Lewis TS, Miller MA, McCormick ML & Britigan BE. (2002). *Leishmania chagasi*: uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. *Experimental Parasitology*, 100: 196-207.
- Wood JD. (1990). Consequences for meat quality of reducing carcass fatness. En: *Reducing Fat in Meat Animals*. Wood JD & Fisher AV (eds). Elsevier Applied Science, London.
- Wouters PC, Glaasker E & Smelt JPPM. (1998). Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 509-515.
- Wu HF, Monroe DM & Church FC. (1995a). Characterization of the glucosaminoglycan-binding region of lactoferrin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317: 85-92.
- Wu HF, Lundblad RL & Church FC. (1995b). Neutralization of heparin activity by neutrophil lactoferrin. *Blood*, 85: 421-428.

- Wuytack EY, Diels AM, Meersseman K & Michiels CW. (2003). Decontamination of seeds for seed sprout production by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 66: 918-923.
- Xiao R & Kisaalita WS. 1997. Iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine. *Microbiology*, 143: 2509-2511.
- Xu YY, Samaranayake YH, Samaranayake LP & Nikawa H. (1999). In vitro susceptibility of *Candida* species to lactoferrin. *Medical Mycology*, 37: 35-41.
- Yamaguchi H, Abe S & Takakura N. (2004). Potential usefulness of bovine lactoferrin for adjunctive immunotherapy for mucosal *Candida* infections. *Biometals*, 17: 245-248.
- Yamamoto K, Hayashi S & Yasui T. (1993). Hydrostatic pressure-induced aggregation of myosin molecules in 0.5 M KCl at pH 6.0. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57: 383-389.
- Yamamoto K, Yoshida Y, Morita JI & Yasui T. (1994). Morphological and physicochemical changes in the myosin molecules induced by hydrostatic pressure. *Journal of Biochemistry*, 116: 215-220.
- Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ & Ellison RT. (1993). Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and Immunity*, 61: 719-728
- Yamauchi K, Hiruma M, Yamazaki N, Wakabayashi H, Kuwata H, Teraguchi S, Hayasawa H, Suegara N & Yamaguchi H. (2000). Oral administration of bovine lactoferrin for treatment of tinea pedis. A placebo-controlled, double-blind study. *Mycoses*, 43: 197-202.
- Yamauchi K, Wakabayashi H, Shin K & Takase M. (2006). Bovine lactoferrin: benefits and mechanism of action against infections. *Biochemistry and Cell Biology*, 84: 291-296.
- Yang N, Stensen W, Svendsen JS & Rekdal Ø. (2002). Enhanced antitumor activity and selectivity of lactoferrin-derived peptides. *The Journal of Peptide Research*, 60: 187-197.
- Ye XY, Wang HX, Liu F & Ng TB. (2000). Ribonuclease, cell-free translation-inhibitory and superoxide radical scavenging activities of the iron-binding protein lactoferrin from bovine milk. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32: 235-241.
- Yi M, Kaneko S, Yu DY & Murakami S. (1997). Hepatitis C virus envelope proteins bind lactoferrin. *Journal of Virology*, 71: 5997-6002.
- Yoo YC, Watanabe R, Koike Y, Mitobe M, Shimazaki K, Watanabe S & Azuma I. (1997). Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237: 624-628.
- Yoshika K, Kage Y & Omura H. (1992). Effects of high pressure on texture and ultrastructure of fish and chicken muscles and their gels. *High Pressure and Biochemistry*. Blany C,

- Hayashi R, Heremans K & Masson P (eds). John Libbey Eurotext, Montrouge. pp.325-328.
- Yu RH & Schryvers AB. (2000). Bacterial lactoferrin receptors. Insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 81-90.
- Yuste JM, Mor-Mur M, Capellas M, Guamis B & Pla R. (1999). Mechanically recovered poultry meat sausages manufactured with high hydrostatic pressure. *Poultry Science*, 78: 914-921.
- Zagulski T, Lipinski P, Zagulska A, Broniek S & Jarzabek Z. (1989). Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection in vivo. *British Journal of Experimental Pathology*, 70: 697-704.
- Zasytkin DV, Dumay E & Cheftel JC. (1996). Pressure- and heat-induced gelation of mixed β -lactoglobulin/xanthan solutions. *Food Hydrocolloids*, 10: 203-211.
- Zhao XY & Hutchens TW. (1994). Proposed mechanisms for the involvement of lactoferrin in the hydrolysis of nucleic acid. En: *Lactoferrin: Structure and Function*. Hutchens TW, Rumball SV & Lönnnerdal B (eds). Plenum Press, New York.
- Ziere GJ, Van Dijk MCM, Bijsterbosch MK & Van Berkel TJC. (1992). Lactoferrin uptake by the rat liver. Characterization of the recognition site and effect of selective modification of arginine residues. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 11229-11235.
- Zimecki M, Artym J & Kocięba M. 2009. Endogenous steroids are responsible for lactoferrin-induced myelopoiesis in mice. *Pharmacological Reports*, 61: 705-710.

OBJETIVOS DE LA TESIS

El presente estudio se realizó en el Departamento de Tecnología de Alimentos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Está integrado en la línea de investigación del Proyecto Carnisenusa (Consolider Ingenio 2010), subproyecto PROCARTE, basado en el estudio de tecnologías emergentes para la higienización de productos cárnicos listos para su consumo, contribuyendo así a la mejora de la seguridad de los alimentos elaborados por la industria cárnica española.

El **objetivo principal** del presente trabajo de investigación fue evaluar el potencial de la lactoferrina y algunos de sus derivados como antimicrobianos, de cara a su aplicación como bioconservantes en carne y productos cárnicos. La lactoferrina es una proteína presente de forma natural en la leche de mamíferos que, como hemos visto, además de ejercer un efecto antimicrobiano podría desempeñar otras muchas funciones beneficiosas para el organismo, por lo que su incorporación en alimentos como bioconservante podría conllevar otra serie de ventajas, dando así lugar al desarrollo de alimentos seguros, y al mismo tiempo, funcionales.

Para la consecución de este objetivo principal se evaluaron los siguientes aspectos:

- Actividad antimicrobiana de la lactoferrina y algunos de sus derivados en condiciones *in vitro* (en tampón, medio sencillo y definido) sobre distintas bacterias patógenas y alterantes, gram positivas y gram negativas, que pueden contaminar carne y productos cárnicos.
- Actividad antibacteriana de la lactoferrina y sus derivados frente a bacterias patógenas y alterantes, en carne.
- Efecto de diversos factores que podrían influir sobre la actividad antibacteriana de la lactoferrina y sus derivados, como factores asociados al microorganismo, factores asociados al medio e interacciones entre los propios compuestos antimicrobianos.

Como consecuencia del limitado efecto bactericida ejercido por la LF y sus derivados en carne, tratamos finalmente de potenciar dicho efecto mediante su uso combinado con tratamientos de altas presiones hidrostáticas, con vistas a su posible aplicación para la conservación de la carne y productos cárnicos. Se evaluaron así:

- El efecto antimicrobiano de las altas presiones hidrostáticas, aplicadas individualmente y en combinación con la LF y sus derivados, frente a distintas bacterias patógenas y alterantes en carne.
- El efecto de factores como el nivel de presión, momento de incorporación de los antimicrobianos y concentración de los mismos, sobre la actividad bactericida resultante del uso combinado de la LF y sus derivados con la presurización.



Capítulo 2

Efecto bactericida de la lactoferrina bovina y sus derivados amidados y digeridos con pepsina sobre *Pseudomonas fluorescens*: influencia de diversos factores fisiológicos y del medio.

Fotografía: *Pseudomonas fluorescens* ATCC948 en agar TSYE.

Bactericidal Effect of Lactoferrin and Its Amidated and Pepsin-Digested Derivatives on *Pseudomonas fluorescens*: Influence of Environmental and Physiological Factors

ANA DEL OLMO, PILAR MORALES, AND MANUEL NUÑEZ*

Departamento de Tecnología de los Alimentos, INIA, Carretera de la Coruña Km 7, Madrid, 28040 Spain

MS 08-077: Received 13 February 2008/Accepted 9 May 2008

ABSTRACT

The influence of environmental and physiological factors such as substrate composition and inoculum characteristics on the bactericidal activity of bovine lactoferrin (LF) and its amidated and pepsin-digested derivatives against *Pseudomonas fluorescens* was investigated. Amidated LF (AMILF) exerted the most potent bactericidal activity, with a 5.8-log decrease in *P. fluorescens* counts, and LF the lowest, with just a 1-log decrease, whereas pepsin-digested LF (PDLF) reduced bacterial counts by 2.7 log, after 1 h at 30°C. Amidation of PDLF increased effectiveness by 1.2 log, whereas pepsin digestion of AMILF decreased effectiveness by 2.8 log. Bactericidal activity of LF and its derivatives was higher in Tris buffer than in phosphate buffer. The bactericidal effect of AMILF and PDLF was enhanced as medium pH was increased from 5.5 to 8.5, whereas LF showed higher activity under acidic or basic conditions than at neutral pH. The presence of cations affected the activity of LF and its derivatives, from a concentration of 10 mM for K⁺, 1 mM for Na⁺, and 0.1 mM for Ca²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, and Fe³⁺. Bactericidal effectiveness diminished as the bacterial inoculum was increased. Log-phase cultures (10-h incubation) were less sensitive to the bactericidal activity of LF and its derivatives than stationary cultures (20- and 30-h incubation). All these factors should be considered when applications of LF and its derivatives in foods and other complex systems are investigated.

Lactoferrin (LF) is a single-chain iron-binding glycoprotein of approximately 80 kDa, which was first isolated from bovine and human milk and colostrums. It is found in many other fluids of mammals such as tears, saliva, pancreatic juice, synovia, seminal fluid, mucosal secretions, and blood. The LF molecule contains 1 to 4 glycans, depending on the animal species, and is folded into two globular lobes, N- and C-terminal, each containing an iron binding site. Lactoferrin presents a high affinity for iron, but it can also bind other metal ions such as copper, aluminum, manganese, cobalt, zinc, gallium, and trivalent lanthanides. Although LF structure is well known, its biological functions, mechanisms of action, and prophylactic and therapeutic uses remain the subjects of intense investigation. A great variety of biological functions have been described for LF, including bacteriostatic, bactericidal, fungicidal, antiprotozoal, and antiviral activities, as well as synergy with other antimicrobial milk proteins (3, 10, 18, 28, 33).

Lactoferrin iron-sequestering ability is at the basis of its bacteriostatic effect, whereas the bactericidal activity is mediated by binding to or altering bacteria cell wall components. The N-terminus of LF molecule has strong cationic peptide regions, which are responsible for LF binding characteristics. Bovine lactoferricin is a basic peptide of 25 amino acid residues, resulting from the peptic digestion of the N-terminal domain of the LF molecule. Lactoferricin presents a much greater antibacterial activity than native LF,

but its precise mode of action is not fully elucidated, although as reported for LF, it is thought to interact with and to alter membrane components, causing depolarization, loss of membrane integrity, and loss of the pH gradient (10, 12, 14, 15).

Lactoferrampin is another positively charged peptide, corresponding to residues 268 to 284 of bovine LF, which has also been shown to present a higher antimicrobial activity than LF. Because increased net positive charges appear to markedly enhance the antimicrobial activity of the protein and because amidation of proteins increases their positive charges, Pan et al. (23, 24) reported LF amidation and how the amidated LF exerts a broader spectrum and much greater antimicrobial activity than the native molecule.

Owing to their broad-spectrum antibacterial properties, LF and its derived compounds have been proposed as natural preservatives in foods (20). However, factors such as water activity and pH and components of foodstuffs such as proteins, lipids, carbohydrates, and cations might interfere with the antibacterial activity of LF and its derivatives (1, 9, 19, 32). Additional information about their functional properties and the conditions for optimal activity is therefore required to support their development as antimicrobial agents. In this article, we have compared the inhibitory effect of LF, amidated LF, and pepsin-digested LF on *Pseudomonas fluorescens*, a psychrotrophic bacterium responsible for food spoilage. The influence of environmental and physiological factors such as substrate composition and in-

* Author for correspondence. Tel: 34-913476799; Fax: 34-913572293; E-mail: nunez@inia.es.



Capítulo 3

Actividad bactericida de la lactoferrina y sus derivados amidado y digerido con pepsina frente a *Pseudomonas fluorescens* en carne picada y fracciones cárnicas.

Fotografía: microbiota endógena de carne picada de ternera, en agar TSYE.

Bactericidal Activity of Lactoferrin and Its Amidated and Pepsin-Digested Derivatives against *Pseudomonas fluorescens* in Ground Beef and Meat Fractions

ANA DEL OLMO, PILAR MORALES, AND MANUEL NUÑEZ*

Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria,
Carretera de la Coruña Km 7, Madrid 28040, Spain

MS 08-254: Received 3 June 2008/Accepted 10 October 2008

ABSTRACT

The antibacterial activity of lactoferrin (LF) and its amidated and pepsin-digested derivatives (AMILF and PDLF, respectively) against *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 in ground beef was investigated. LF, AMILF, and PDLF at 1 mg/ml decreased bacterial counts by 1.9, 6.4, and 3.5 log units, respectively, after 1 h at 30°C when the assays were performed in distilled water, but their bactericidal activity disappeared when added at 1 mg/g to ground beef held for 24 h at 5°C. To identify meat components responsible for the loss of bactericidal activity, ground beef was homogenized and separated into fractions of different molecular weights. When cations were removed (fraction > 1 kDa), the bactericidal activity of AMILF was completely restored, whereas the effectiveness of LF and PDLF remained 1.0 and 0.4 log units lower, respectively, than the results obtained in distilled water. EDTA at 5 mM greatly enhanced the bactericidal activity of the three antimicrobials at 1 mg/ml in meat homogenate and in the presence of 5 mM sodium bicarbonate completely restored the bactericidal activity. However, when 1 mg/g AMILF, 5 mM sodium bicarbonate, and increasing EDTA concentrations were added to inoculated ground beef, bacterial counts declined by only 0.2, 0.4, and 1.2 log units in the presence of 8, 32, and 128 mM EDTA, respectively, after 24 h at 5°C.

Lactoferrin (LF) is a single-chain iron-binding glycoprotein of approximately 80 kDa molecular mass that is closely related in structure to transferrin (9). LF was first isolated from bovine and human milk and is found in many other secretions such as colostrum, tears, saliva, blood, neutrophils, leukocytes, pancreatic juice, and synovial, seminal, and mucosal fluids (32, 35). Biological functions described for LF include bacteriostatic and bactericidal activity (24), fungicidal, antiprotozoal, and antiviral activity, and synergy with other antimicrobial milk proteins such as lysozyme and immunoglobulins (9, 21).

Lactoferricin is a basic peptide resulting from pepsin cleavage of the N-terminal domain of LF. Bovine lactoferricin consists of 25 amino acid residues (17). Purified lactoferricin and the nonpurified pepsin-digested lactoferrin (PDLF) have a higher level of antimicrobial activity than does native LF and exert a broad-spectrum antibacterial effect against gram-positive and gram-negative bacteria (4). Amidated lactoferrin (AMILF) results from the chemical amidation of LF, a procedure reported to increase the net positive charge of the molecule and thus enhance its bactericidal activity against a wide range of gram-positive and gram-negative bacteria (26, 27).

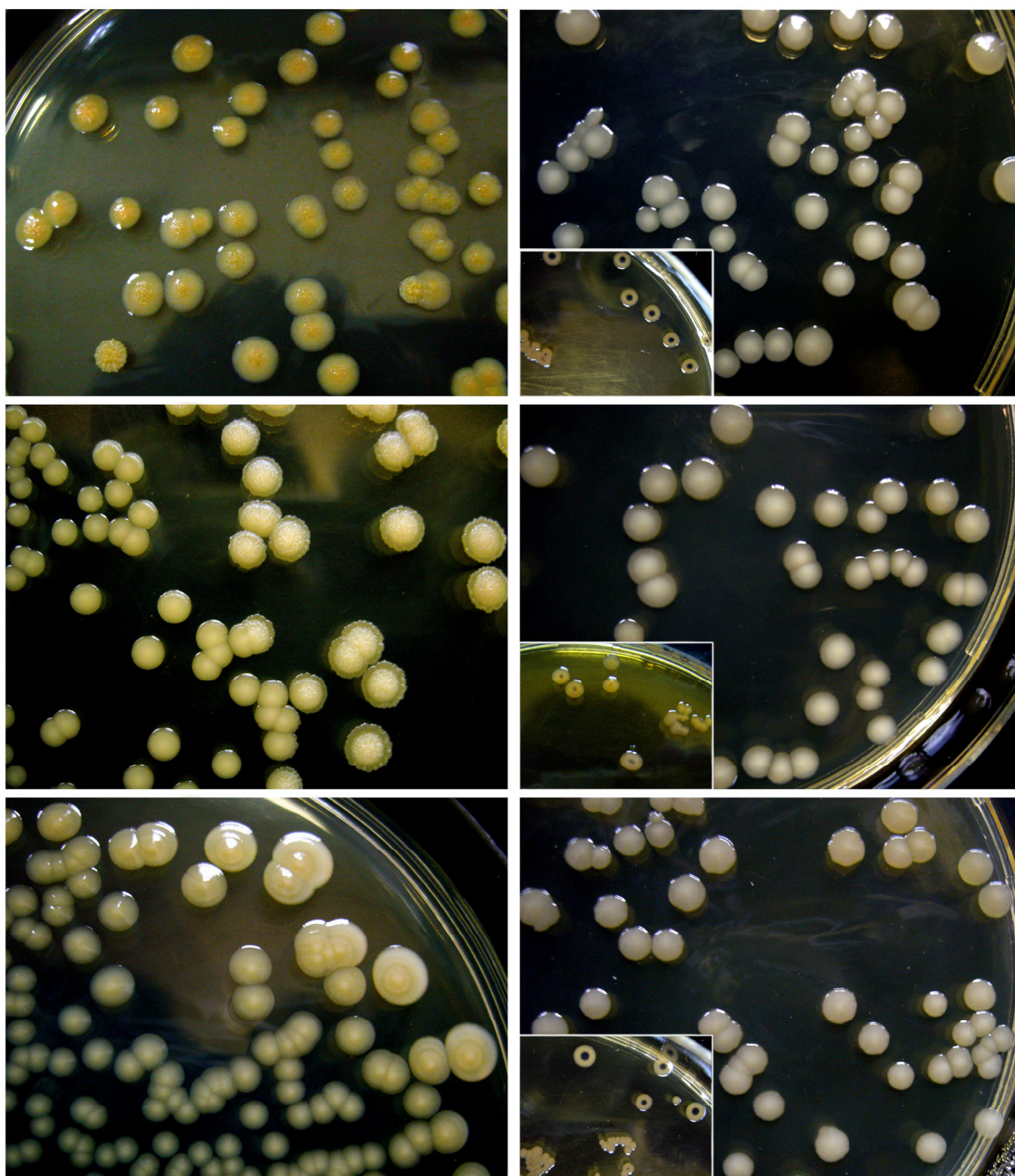
LF and its derivatives have been proposed as natural preservative agents in foods, as an alternative to thermal treatment for controlling foodborne pathogens, and as func-

tional components of new clinical foods for the prevention or treatment of infectious diseases (1, 22, 23). However, to our knowledge in vivo studies of the antibacterial activity of LF and its derivatives in food systems are scarce for LF and PDLF and nonexistent for AMILF. Some authors have indicated the limited potential of these compounds when used as antimicrobial agents in food (1, 8, 22).

These antimicrobials are thought to require electrostatic interactions with the outer and/or cytoplasmic bacterial membrane to exert their bactericidal effect (3, 4). However, bovine lactoferricin is capable of crossing over the bacterial membrane of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (17). When used in complex systems, various mechanisms could interfere with or abolish the effect of these compounds by preventing them from reaching their targets, inhibiting the biological activity of the molecule, or restoring the physical balance perturbed by the antimicrobial (33). Factors in foodstuffs such as water activity and pH and food components such as lipids, proteins, carbohydrates, and cations have been reported to interfere with the antibacterial activity of LF and its derivatives (5, 8, 22).

We studied the potential use of LF and two of its derivatives, AMILF and PDLF, as natural preservatives in ground beef, investigating which components or fractions of meat could interfere with the antibacterial activity of these compounds in an attempt to overcome the decrease in effectiveness when these antimicrobials are used in complex systems.

* Author for correspondence. Tel: 34-913476799; Fax: 34-913572293;
E-mail: nunez@inia.es.



Capítulo 4

Efecto antimicrobiano de la lactoferrina y sus derivados amidado y digerido con pepsina frente a *Salmonella* Enteritidis y *Pseudomonas fluorescens*.

Fotografía: *Pseudomonas fluorescens* en agar TSYE (izquierda) y *Salmonella* Enteritidis en agar TSYE (derecha) o en agar SS (derecha, en recuadro). Cepas ATCC 948 (izquierda, superior), ATCC 49838 (izquierda, centro), INIA 724 (izquierda, inferior), CECT 4155 (derecha, superior), CECT 4300 (derecha, centro) y CECT 4396 (derecha, inferior).



Short communication: Antimicrobial effect of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against *Salmonella* Enteritidis and *Pseudomonas fluorescens*

A. Del Olmo, J. Calzada, and M. Nuñez¹

Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, Carretera de la Coruña Km 7, Madrid, 28040 Spain

ABSTRACT

The antimicrobial effect of bovine lactoferrin (LF) and its amidated and pepsin-digested derivatives, at concentrations varying from 0.25 to 20 mg/mL, against 3 *Salmonella* Enteritidis strains and 3 *Pseudomonas fluorescens* strains was investigated. Lactoferrin showed its maximum antimicrobial effect at 10 mg/mL against the 3 *Salmonella* strains, with reductions ranging from 1.3 to 2.0 log units, and the 3 *Pseudomonas* strains, with reductions ranging from 1.8 to 5.4 log units. In the case of amidated LF, the maximum effect on the 3 *Salmonella* strains was recorded at 0.25 mg/mL, with reductions in the range of 0.8 to 1.2 log units, whereas it was recorded at 1 mg/mL for the 3 *Pseudomonas* strains, with reductions in the range of 4.4 to 6.0 log units. Pepsin-digested LF showed its maximum antimicrobial effect at 1 mg/mL against the 3 *Salmonella* strains, with reductions ranging from 2.6 to 3.4 log units, and at 20 mg/mL against the 3 *Pseudomonas* strains, with reductions ranging from 4.5 to 5.4 log units. It is worth noting the pronounced effect (reductions exceeding 2.5 log units) of a low (1 mg/mL) concentration of pepsin-digested LF, which is naturally formed in the gastrointestinal tract, on *Salmonella* and *Pseudomonas* strains. A highly significant inverse correlation was found between capsule polysaccharide levels of bacterial strains and their lethality in the presence of different concentrations of amidated lactoferrin.

Key words: lactoferrin, derivative, *Salmonella*, *Pseudomonas*

Lactoferrin (LF), a single-chain iron-binding glycoprotein of approximately 80 kDa, constitutes one of the major antimicrobial systems in milk and various mammalian exocrine secretions (Steijns and van Hooijdonk, 2000). Lactoferricin (LFC) is a basic peptide resulting from pepsin cleavage on the N-terminal domain of LF (Bellamy et al., 1992). Amidated lactoferrin (AMILF)

is obtained by chemical amidation of LF (Pan et al., 2007). Both LF derivatives have been reported to exert a more potent antibacterial activity than the native molecule, because of its lower molecular weight (approximately 3 kDa) in the case of the LFC molecule (Bellamy et al., 1992), and because of the increase in the net positive charges in the case of the AMILF molecule (Pan et al., 2007).

Inter-species and strain-to-strain variations in the sensitivity of bacteria to LF and its derivatives have been observed. Also, many factors influence the antimicrobial activity of LF and its derivatives, including temperature, water activity, ionic strength, pH, medium composition, presence of cations, microbial population, and stage of growth (Brannen and Davidson, 2000; Del Olmo et al., 2008). Independently of the natural activity of LF and some of its derivatives in the digestive tract, these compounds are interesting options for use as natural food preservatives, because of their origin and antimicrobial activity (Payne et al., 1990; Naidu, 2002; Murdock et al., 2007).

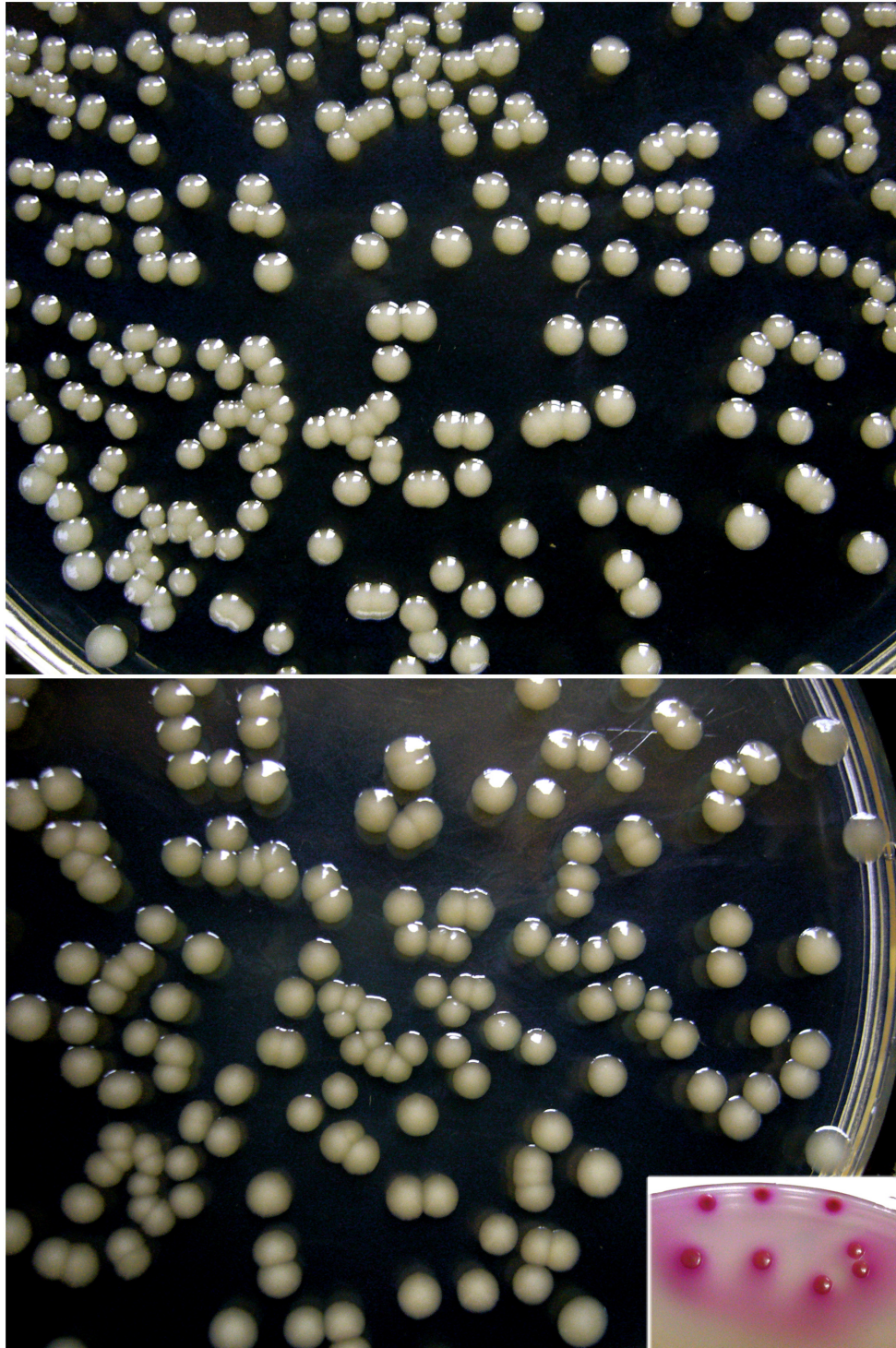
We have compared the antimicrobial effect of LF and its amidated and pepsin-digested (PDLF) derivatives against *Salmonella* Enteritidis, a pathogen that may be found in milk and dairy products, and *Pseudomonas fluorescens*, a bacterium responsible for the spoilage of milk and dairy products during refrigerated storage. The role of capsule polysaccharide on the resistance of bacterial strains to these antimicrobials was also studied.

Bovine LF, partially (15 to 20%) iron saturated according to the manufacturer, was obtained from DMV International (Barcelona, Spain). A 250 mg/mL solution of LF in double-distilled sterile water was used as the stock solution for assays. Amidated lactoferrin was prepared from a 20 mg/mL LF solution as described by Pan et al. (2007) and then concentrated 10-fold by lyophilization. Pepsin-digested lactoferrin was prepared from a 250 mg/mL LF solution as described by Dionysius et al. (1993). Stock solutions of the 3 antimicrobials were sterilized by means of 0.20- μ m-pore-size cellulose acetate filters (Millipore, Bedford, MA) and stored at -20°C until use.

Received February 9, 2010.

Accepted May 22, 2010.

¹Corresponding author: nunez@inia.es



Capítulo 5

Efecto antimicrobiano de la lactoferrina, sus derivados amidado y digerido con pepsina, y sus combinaciones, sobre *Escherichia coli* O157:H7 y *Serratia liquefaciens*.

Fotografía: *Serratia liquefaciens* INIA 745 en agar TSYE (superior) y *Escherichia coli* O157:H7 CECT 4972 en agar TSYE (inferior) o en agar VRB (inferior, en recuadro).

ORIGINAL ARTICLE

Antimicrobial efficacy of lactoferrin, its amidated and pepsin-digested derivatives, and their combinations, on *Escherichia coli* O157:H7 and *Serratia liquefaciens*

A. Del Olmo, J. Calzada and M. Nuñez

Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, Madrid, Spain

Keywords

bactericidal, derivatives, *Escherichia*, lactoferrin, *Serratia*.

Correspondence

Manuel Nuñez, Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, Carretera de la Coruña Km 7, 28040 Madrid, Spain.
E-mail: nunez@inia.es

2010/0887: received 25 May 2010, revised 24 September 2010 and accepted 5 October 2010

doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02957.x

Abstract

Aims: To evaluate the *in vitro* bactericidal efficacy of lactoferrin (LF), its amidated (AMILF) and pepsin-digested (PDLF) derivatives, and their combinations, on *Escherichia coli* O157:H7 and *Serratia liquefaciens*.

Methods and Results: PDLF exhibited the most potent bactericidal efficacy on *E. coli* O157:H7 ($>2.5 \log_{10}$ CFU ml⁻¹ reduction at concentrations ≥ 1 mg ml⁻¹), and AMILF on *Ser. liquefaciens* (1 log₁₀ CFU ml⁻¹ reduction at 0.25–0.50 mg ml⁻¹). Some combinations of LF with PDLF or AMILF showed a slight synergy on *E. coli* O157:H7 and *Ser. liquefaciens*. However, all combinations of AMILF with PDLF were less active than the sum of the individual effects of the two antimicrobials. Production of capsular polysaccharide by bacteria might be involved in antimicrobial resistance.

Conclusions: *Escherichia coli* O157:H7 and *Ser. liquefaciens* showed marked differences in the sensitivity to LF and its derivatives. *E. coli* O157:H7 was strongly inhibited by PDLF, whereas the effect of LF and its derivatives on *Ser. liquefaciens* was weak to negligible.

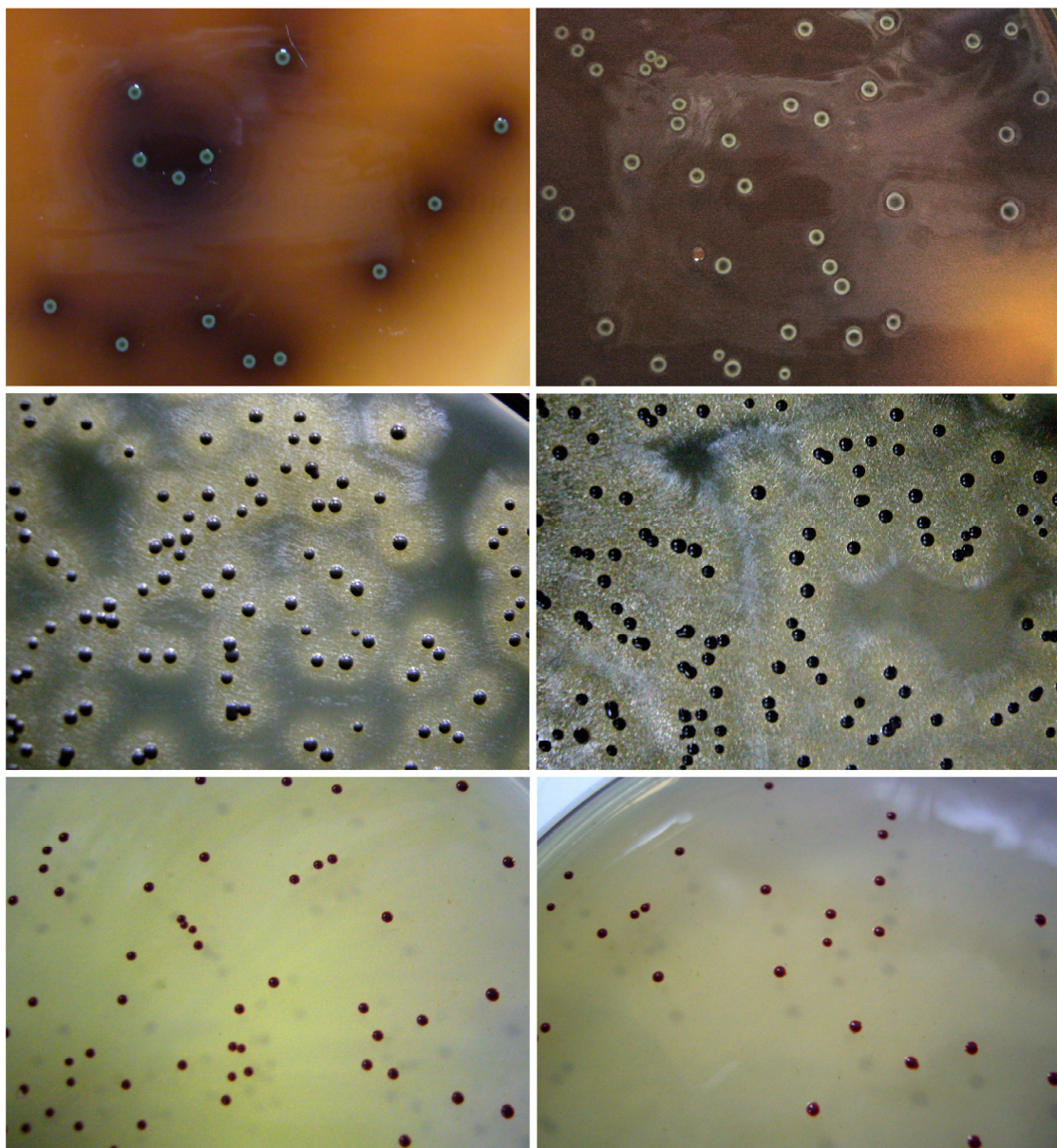
Significance and Impact of the Study: PDLF was the most promising of the tested antimicrobials on *E. coli* O157:H7. However, the resistance of *Ser. liquefaciens* to LF and its derivatives hinders their use in the food industry.

Introduction

Lactoferrin (LF), a single-chain iron-binding glycoprotein of approximately 80 kDa, constitutes one of the major antimicrobial systems in milk and various mammalian exocrine secretions. Biological properties reported for LF include antimicrobial activity against a wide range of pathogenic bacteria, as well as anti-inflammatory, antitumour and immuno-modulatory activities (Steijns and van Hooijdonk 2000). Concentrations of LF in human milk range from 1 to 6 mg ml⁻¹, and in human colostrums from 4 to 16 mg ml⁻¹, whereas lower levels have been reported for milk from other mammals (Hirai *et al.* 1990; Korhonen and Marnila 2002). Lactoferricin, a basic peptide generated by pepsin cleavage of the N-terminal domain of LF, shows a higher antimicrobial activity than that exerted by the native LF, probably owing to its lower

molecular weight, approximately 3 kDa (Bellamy *et al.* 1992; Dionysius and Milne 1997). Amidated lactoferrin (AMILF), which results from the chemical amidation of LF, exhibits a more potent bactericidal activity that has been attributed to the increase in the net positive charges of the molecule (Pan *et al.* 2007a,b).

Antimicrobial peptides, such as LF and its derivatives, have a net positive charge, and the three-dimensional folding results in an amphipathic structure. Their microbicidal action is initiated through electrostatic interactions with the bacterial surface, and their lethality is linked to membrane perturbation, although they may have also intracellular targets (Yamauchi *et al.* 1993). Many factors have been reported to influence their antimicrobial activity, including temperature, water activity, ionic strength, pH, medium composition, presence of cations, microbial population and stage of growth (Bellamy *et al.* 1992; Del



Capítulo 6

Efecto de la lactoferrina y sus derivados sobre bacterias gram positivas en condiciones *in vitro*, y en filetes de pechuga de pollo en combinación con altas presiones.

Fotografía: *Listeria monocytogenes* en agar Palcam (superior), *Staphylococcus aureus* en agar BP (centro) y *Enterococcus faecalis* en agar KF (inferior). Cepas CECT 5725 (superior, izquierda), S7-1 (superior, derecha), CECT 976 (centro, izquierda), INIA 238 (centro, derecha), EF (inferior, izquierda) y ESI 81 (inferior, derecha).



Effect of lactoferrin and its derivatives against gram-positive bacteria *in vitro* and, combined with high pressure, in chicken breast fillets

Ana Del Olmo, Javier Calzada, Manuel Nuñez*

Departamento de Tecnología de los Alimentos, INIA, Carretera de la Coruña Km 7, Madrid 28040, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2010

Received in revised form 14 April 2011

Accepted 1 June 2011

Keywords:

Lactoferrin

Amidation

Pepsin digestion

Activated

High pressure

ABSTRACT

The bactericidal activity of lactoferrin (LF), amidated lactoferrin (AMILF), pepsin digested lactoferrin (PDLF), and its activated (ALF) commercial form, against six strains of three gram-positive bacterial species was investigated. *Listeria monocytogenes* was most sensitive *in vitro*, *Staphylococcus aureus* showed a moderate resistance, and *Enterococcus faecalis* was highly resistant to antimicrobials. When chicken breast fillets were inoculated with *L. monocytogenes* CECT5725 and treated with antimicrobials, reductions were below 0.5 log CFU/ml in all cases. In combination with high pressure (HHP) treatment at 400 MPa for 10 min, antimicrobials showed a slight additional bactericidal effect, always below 1 log CFU/g. Incorporation of antimicrobials 18 h before or 1 h after HHP treatment generally yielded better results than incorporation 1 h before HHP treatment, although reductions remained below 1.5 log CFU/g in all cases. LF and its derivatives showed a limited potential for pathogen control in meat.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lactoferrin (LF) is a single-chain iron-binding glycoprotein of approximately 80 kDa molecular mass, found in many other secretions of mammals such as tears, saliva, blood, neutrophils, leukocytes, pancreatic juice, and synovial, seminal and mucosal fluids. Bacteriostatic, bactericidal, fungicidal, antiparasitic and antiviral activities have been described for LF (Jenssen & Hancock, 2009; Legrand et al., 2008; Naidu, 2000). Lactoferricin (LFC) is a basic peptide resulting from pepsin cleavage of the N-terminal domain of LF. Purified LFC and the non-purified pepsin digested lactoferrin (PDLF) have been reported to exert a more potent and a broad-spectrum of bactericidal effect than the native LF, probably due to their smaller size (Dionysius & Milne, 1997; Jones, Smart, Bloomberg, Burgess, & Millar, 1994). Amidated lactoferrin (AMILF) results from the chemical amidation of LF, a procedure reported to increase the net positive charge of the molecule and to enhance its bactericidal activity against a wide range of microorganisms (Pan, Shiell, et al., 2007; Pan, Wan, et al., 2007). Activated lactoferrin (ALF), also known as stabilized or immobilized LF, is the result of a patented technology (Naidu, 2001). Its commercial form, Activin™, is formulated for enhancing antimicrobial functions by using a specific molecular-milieu optimization process that includes in its formulation citrate, bicarbonate, EDTA, sodium chloride, immobilized LF with polysaccha-

rides via cationic N-terminus, and an excess of unbound LF (Naidu, 2001, 2002).

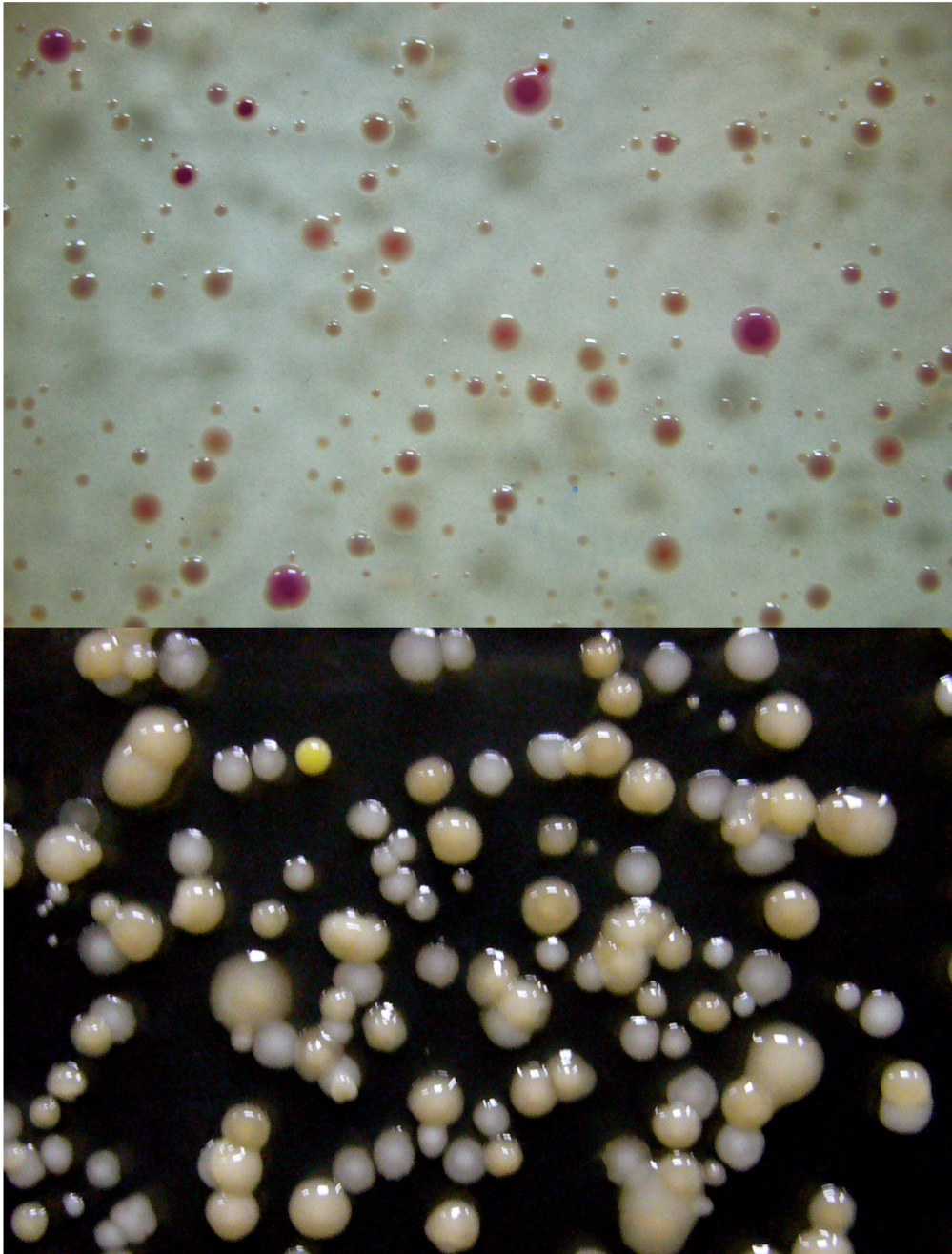
LF and its derivatives are considered to require electrostatic interactions with the outer and/or cytoplasmic bacterial membrane to exert their bactericidal effect. Their main mechanism of action is thought to be based on electrostatic interactions with lipopolysaccharide (LPS) molecules causing LPS release and altering the outer membrane permeability in gram-negative bacteria (Ellison, 1994; Ulvatne & Vorland, 2001; Ulvatne, Samuelsen, Haukland, Krämer, & Vorland, 2004), or with teichoic (TA) or lipoteichoic (LTA) acids in gram-positive bacteria (Vorland, Ulvatne, Rekdal, & Svendsen, 1999).

Owing to their broad-spectrum antibacterial properties, LF and its derivatives have been proposed as natural preservatives in foods. However, when used in complex systems such as foods many factors influence or even suppress their microbicidal activity. These factors include temperature, water activity, ionic strength, pH, bacterial population, stage of growth, medium composition, presence of salts or cations, and different proteic, lipidic or glucidic components (Arnold, Russell, Champion, & Gauthier, 1981; Brannen & Davidson, 2000; Del Olmo, Morales, & Nuñez, 2008; Murdock & Matthews, 2002).

High hydrostatic pressure (HHP) can achieve the same food safety standards as heat pasteurization, while meeting the demand for fresh-tasting minimally processed foods (Considine, Kelly, Fitzgerald, Hill, & Sleator, 2008). HHP has been demonstrated to inactivate microorganisms by causing inhibition of key enzymes and of protein synthesis, as well as altering the cell morphology and the cell membrane (Cheftel, 1995; Hoover, Metrick, Papineau, Farkas, & Knorr, 1989; Mackey, Forestière, Isaacs, Stenning, & Brooker, 1994). The extent of inactivation depends on pressurization conditions (pressure

* Corresponding author. Tel.: +34 913476799; fax: +34 913572293.

E-mail address: nunez@inia.es (M. Nuñez).



Capítulo 7

Efecto de la lactoferrina, sus derivados, las altas presiones hidrostáticas y sus combinaciones, sobre *Escherichia coli* O157:H7 y *Pseudomonas fluorescens* en filetes de pollo.

Fotografía: *Enterobacteriaceae* y coliformes (enterobacterias lactosa +) endógenas del pollo en agar VRB (superior) y microbiota endógena del pollo en agar TSYE.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Innovative Food Science and Emerging Technologies

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ifset

Effect of lactoferrin and its derivatives, high hydrostatic pressure, and their combinations, on *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas fluorescens* in chicken filets

Ana Del Olmo, Javier Calzada, Manuel Nuñez*

Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, Carretera de la Coruña Km 7, Madrid, 28040, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2011

Accepted 29 July 2011

Available online xxxx

Editor Proof Receive Date 19 September 2011

Keywords:

Lactoferrin

Derivatives

High pressure

E. coli O157:H7*Pseudomonas fluorescens*

Chicken filets

ABSTRACT

Bovine lactoferrin, amidated or pepsin-digested lactoferrin, and activated lactoferrin, all at 0.5 mg/g, and high pressure treatments at 200, 300, 400, and 500 MPa for 10 min at 10 °C, were assayed against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas fluorescens* inoculated on chicken filets at levels of 7.2 and 6.5 log CFU/g, respectively. After treatments, filets were held at 5 °C for 9 days. Antimicrobials, by themselves, reduced counts of *E. coli* O157:H7 and *P. fluorescens* by a maximum of 0.6 and 0.8 log CFU/g, respectively. Treatment at 400 MPa, by itself, lowered counts of inoculated *E. coli* O157:H7 by more than 5 log CFU/g and those of inoculated *P. fluorescens* by more than 6 log CFU/g. A synergistic effect on *P. fluorescens* was observed when treatment at 300 MPa was combined with lactoferrin, with a 2.3 log CFU/g additional reduction in counts on day 9, with respect to only 300 MPa treatment. Additional reductions in *E. coli* O157:H7 counts achieved by combined treatments remained below 0.5 log CFU/g.

Industrial relevance: Lactoferrin and its derivatives, by themselves, had a limited potential for bacterial control in chicken filets. High hydrostatic pressure reduced efficiently counts of *E. coli* O157:H7 and *P. fluorescens* in chicken filets. The combination of high pressure treatments with LF and its derivatives showed a synergistic effect.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lactoferrin (LF) is an iron-binding glycoprotein of approximately 80-kDa molecular mass, closely related to transferrins. It is a key element of the innate host defense system in mammals, and exerts antimicrobial activities against a broad range of Gram-positive and Gram-negative bacteria (Jenssen & Hancock, 2009). LF has been described to exert a bacteriostatic effect based on its iron-sequestering ability, whereas its bactericidal activity is thought to be mediated by binding to or altering bacterial cell wall components, such as lipopolysaccharide (LPS) molecules in Gram-negative bacteria and teichoic (TA) or lipoteichoic (LTA) acids in Gram-positive bacteria, causing depolarization, loss of membrane integrity and loss of the pH gradient (Ellison, 1994; Vorland, Ulvatne, Rekdal, & Svendsen, 1999). Amidated lactoferrin (AMILF) results from the chemical amidation of LF, and exerts a more potent bactericidal effect than the native molecule due to the increase in the net positive charge (Pan et al., 2007). Pepsin-digested lactoferrin (PDLF) results from pepsin cleavage of the N-terminal domain of LF, and exhibits increased bactericidal activity attributed to its minor size and minor steric hindrance (Bellamy, Takase, Wakabayashi, Kawase, &

Tomita, 1992; Dionysius & Milne, 1997). Along with their antibacterial properties, various biological properties have been described for lactoferrin and its derivatives, including antiinflammatory, immunomodulatory, antiviral and anticarcinogenic effects. These attributes have increased interest for their use as natural bioactive ingredients and preservatives in foods, but commercial uses of these compounds are limited by the scarcity of information on their ability to act and maintain activity in foods. At present, just activated lactoferrin (activin™) is being used in food preservation. Activated lactoferrin (ALF), considered Generally Recognized as Safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA) since 2001, can be sprayed onto carcasses or applied to beef surface prior to final packaging (Naidu, 2001).

High hydrostatic pressure (HHP) is a non-thermal mild technology of growing interest in food preservation. Pressures between 300 and 600 MPa are known to inactivate yeast, molds and most vegetative bacteria (Cheftel, 1995; Considine, Kelly, Fitzgerald, Hill, & Sleator, 2008; Hoover, Metrick, Papineau, Farkas, & Knorr, 1989). The effect of pressure on microorganisms depends on a number of factors relating to the microorganism itself (strain, cell growth phase), substrate characteristics, and pressurization variables (pressure level, time and temperature). Overall, Gram-positive bacteria are more resistant to pressure than Gram-negative, although some Gram-negative bacteria are known to present high resistance (Kalchayanand, Sikes, Dunne, & Ray, 1998; Shigehisa, Ohmori, Saito, Taji, & Hayashi, 1991). The ability of bacteria

* Corresponding author. Tel.: +34 913476799; fax: +34 913572293.

E-mail address: nunez@inia.es (M. Nuñez).



Capítulo 8

Discusión General

Fotografía: microbiota endógena del pollo en agar TSYE.

DISCUSIÓN

La bioconservación de los alimentos se define como “la extensión de la vida útil y la seguridad de un alimento mediante el uso de microbiota natural o controlada y/o de sus compuestos antimicrobianos” (Stiles, 1996), obteniéndose así alimentos mínimamente procesados pero microbiológicamente seguros. Dentro de este campo, la lactoferrina y sus derivados constituyen una interesante opción como antimicrobianos naturales que añadidos a los alimentos podrían permitir el control de la microbiota patógena y alterante. Además, debido a su carácter multifuncional y a la gran cantidad de acciones reguladoras y beneficiosas que según numerosos trabajos de investigación pueden desempeñar en el organismo (actividad antioxidante, inmunoreguladora, osteoblástica, antitumoral, etc), aportarían un valor añadido al producto, dando lugar a alimentos funcionales con ventajas nutricionales y para la salud. Son muchas las expectativas que ha creado la lactoferrina desde su aislamiento e identificación por Sørensen & Sørensen en 1939, y son muchos los estudios que desde entonces se han llevado a cabo de cara a su aplicación tanto en el campo de los alimentos como en los de salud, cosmética e higiene. No obstante, todavía no se conocen bien sus mecanismos de acción ni su verdadera efectividad, existiendo controversias entre los resultados obtenidos en laboratorio (en condiciones *in vitro*) y los obtenidos en condiciones *in vivo* o en ensayos clínicos.

En el presente trabajo de investigación nos hemos centrado en la aplicación de la lactoferrina y sus derivados como antimicrobianos naturales en carne y productos cárnicos, basándonos primero en estudios *in vitro* (en tampón), tratando así de determinar la eficacia bactericida de estos antimicrobianos en condiciones definidas frente a diversas bacterias patógenas y alterantes habitualmente presentes en cárnicos y de conocer qué factores podrían afectar a dicha eficacia bactericida. Posteriormente nos hemos centrado en su incorporación y evaluación en matrices cárnicas. Finalmente, debido al escaso efecto antimicrobiano observado para la lactoferrina y sus derivados incorporados en carne, hemos investigado su aplicación combinada con tratamientos de altas presiones hidrostáticas, con el fin de recuperar o potenciar el efecto bactericida de estos antimicrobianos en matrices cárnicas y de evaluar su potencial en la conservación de alimentos.

Para evaluar la **actividad bactericida *in vitro*** de la lactoferrina y sus derivados (AMILF, PDLF y ALF) se establecieron unas condiciones de ensayo en laboratorio, que incluyeron la incubación del microorganismo en presencia del antimicrobiano durante 1 hora en tampón Tris 50 mM (pH 7.0) a 30 °C, que consideramos adecuadas para la evaluación basándonos en trabajos anteriores de otros autores que indican que

la LF y la LFC comienzan a ejercer su acción bactericida rápidamente, a los 10-15 min de contacto con el microorganismo (Arnold *et al.*, 1981; Bellamy *et al.*, 1992b), y alcanzan su efecto máximo a los 30-60 min de exposición (Bellamy *et al.*, 1992b; Ellison, 1994; Dionysius & Milne, 1997; Shin *et al.*, 1998; Haukland *et al.*, 2001; Ulvatne & Vorland, 2001). De este modo se observó un efecto bactericida dosis-dependiente de la lactoferrina y sus derivados sobre distintas bacterias gram negativas y gram positivas, además de una gran variabilidad entre especies y cepas en la susceptibilidad a estos antimicrobianos, como se aprecia en la Tabla 7 (a continuación) y en los Capítulos 3, 4 y 5.

Tabla 7. Rangos de eficacia bactericida (log ufc/ml) obtenidos en condiciones *in vitro* (1 h a 30 °C en buffer Tris), para distintas concentraciones de LF y sus derivados (0.25 a 20 mg/ml) frente a distintos microorganismos patógenos y alterantes.

Microorganismo	LF	AMILF	PDLF	ALF
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC948	1.1-5.4	3.4-5.7	2.1-5.4	1.0-3.2*
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC49838	0.3-4.0	2.9-4.4	1.1-4.5	0.3-3.6*
<i>Pseudomonas fluorescens</i> INIA724	0.2-1.8	3.2-6.0	0.5-4.5	0.5-2.3*
<i>Serratia liquefaciens</i> INIA745	0.0-0.5	0.2-1.1	0.1-0.8	0.1-0.5*
<i>Salmonella</i> Enteritidis CECT4155	0.1-1.4	0.1-0.8	2.0-2.7	0.1-0.7*
<i>Salmonella</i> Enteritidis CECT4300	0.2-1.3	0.1-1.0	1.5-3.1	0.1-1.0*
<i>Salmonella</i> Enteritidis CECT4396	0.3-2.0	0.0-1.2	2.7-3.4	0.1-1.2*
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 CECT4972	0.0-0.3	0.1-0.5	2.0-2.9	0.0-0.8*
<i>Enterococcus faecalis</i> EF	0.1-0.3	0.3-1.1	0.0-0.1	0.0-0.1
<i>Enterococcus faecalis</i> ESI81	0.3-1.0	0.8-1.9	0.3-0.6	0.2-0.6
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT976	0.0-1.1	1.5-2.1	0.9-2.2	0.8-2.2
<i>Staphylococcus aureus</i> INIA238	0.0-0.2	0.8-1.4	0.3-1.1	0.0-0.2
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT5725	2.6-7.4	1.1-5.0	1.5-2.4	1.4-7.1
<i>Listeria monocytogenes</i> INIA S7-1	1.3-2.4	0.7-3.9	1.2-2.2	0.3-1.2

La eficacia se calculó como: (log ufc/ml en control – log ufc/ml en muestra tratada), siendo por tanto el número de unidades logarítmicas en que se ven disminuidos los niveles por la presencia del antimicrobiano.

*, valores no mostrados en los artículos publicados que integran esta Tesis Doctoral pero obtenidos en el desarrollo de la misma.

En general se observó un mayor efecto bactericida para concentraciones altas (5-20 mg/ml) de LF y ALF, concentraciones medias (1-2 mg/ml) de PDLF y concentraciones bajas (0.25-1 mg/ml) de AMILF. Las dos principales teorías que tratan de explicar el mecanismo de actuación de la LF son: 1) un mecanismo de acción similar al del EDTA, que actúa como quelante de cationes estabilizadores de membrana los cuales al ser retirados provocan su desestabilización por repulsión entre moléculas cargadas de membrana como el LPS y ácidos teicoicos (Alakomi *et al.*, 2003), y 2) un

mecanismo similar a la polimixina, que actúa interaccionando electrostáticamente con las cargas negativas del LPS (lípid A) y de los grupos fosfato de ácidos teicoicos, provocando su retirada o liberación de la membrana e induciendo su desestabilización y desestructuración (Gilleland & Conrad, 1980), pudiendo alcanzar el citoplasma, interaccionar con receptores intracelulares e inhibir la síntesis de macromoléculas como el ADN, ARN, ATP y proteínas (Nibbering *et al.*, 2001; Ulvatne *et al.*, 2004). En el caso de la LFC o PDLF, debido a su menor tamaño que la LF nativa, se produciría menor impedimento estérico a nivel de membrana, pudiendo atravesarla más fácilmente y acceder a nivel intracelular (Yamauchi *et al.*, 1993), mientras que la AMILF como consecuencia de la amidación química presenta mayor cantidad de cargas positivas que la LF nativa, y por tanto mayor carácter catiónico y mayor capacidad de interacción electrostática con la superficie microbiana (Pan *et al.*, 2007a,b). Esto explicaría la mayor eficacia bactericida respecto a la LF observada, en general, para concentraciones moderadas de PDLF y más bajas de AMILF, para la cual además un exceso de concentración podría resultar en repulsiones electrostáticas entre las cargas positivas de las propias moléculas de AMILF y, por tanto, en una disminución de eficacia antibacteriana.

No obstante, como ya se ha indicado, se observó una gran variabilidad inter- e intra-especies. Dentro de las bacterias gram negativas, presentó mayor susceptibilidad a la LF y sus derivados *P. fluorescens*, especialmente la cepa ATCC948, seguida de *S. Enteritidis*, siendo *S. liquefaciens* y *E. coli* las más resistentes. Dentro de las gram positivas fue *L. monocytogenes* la especie más sensible a los antimicrobianos, especialmente la cepa CECT5725, seguida de *S. aureus* y siendo *E. faecalis* la especie más resistente. *P. fluorescens*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* presentaron especial susceptibilidad a bajas concentraciones de AMILF, excepto la cepa de *L. monocytogenes* CECT5725 que resultó especialmente susceptible a la LF. *S. Enteritidis* presentó especial susceptibilidad a la PDLF. Dentro de las especies más resistentes a la LF y sus derivados, se observó para *S. liquefaciens* y *E. faecalis* cierta susceptibilidad a bajas concentraciones de AMILF, y en el caso de *E. coli* a altas concentraciones de PDLF. Esta variación en la susceptibilidad a la LF y sus derivados podría explicarse por distintos mecanismos de resistencia desarrollados por los microorganismos, como son la síntesis y liberación al medio de proteasas (metaloproteasas, aminopeptidasas y/o aspartatoproteasas) descritos para cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* capaces de degradar e inactivar rápidamente a la LFC (Ulvatne *et al.*, 2002; Paul & Somkuti, 2010), y la presencia de proteínas de membrana, como en *S. Enteritidis*, capaces también de degradar proteolíticamente a los antimicrobianos (Guina *et al.*, 2000). Son también de gran

importancia las diferencias en la composición y estructura de membrana (Odeberg & Olsson, 1975; Dionysius *et al.*, 1993; Fang & Oliver, 1999; Branen & Davidson, 2004; Pan *et al.*, 2007b), y así por ejemplo se ha visto que hay cepas de *M. luteus* resistentes a la LF debido a la presencia de lipomanano en la superficie bacteriana (De Lillo *et al.*, 1997), y cepas de *P. fluorescens* sensibles a la polimixina, que sin embargo si se cultivan en un medio pobre en fosfato cambian la composición de membrana, aumentando los lípidos ricos en ornitina y cargados positivamente, y se hacen resistentes al antimicrobiano (Dorrer & Teuber, 1977).

Otro factor que podría estar implicado en la resistencia a la LF y sus derivados y en las diferencias inter- e intra-especies es el **polisacárido capsular (CPS)**, como se recoge en el Capítulo 4. El CPS está compuesto por unidades repetidas de monosacáridos y oligosacáridos unidos por enlaces glucosídicos, que forman una cubierta altamente hidratada y aniónica que se une a la superficie bacteriana por enlaces covalentes a lípidos y fosfolípidos (Roberts, 1996). Esta cubierta es rica en glucosa, manosa, ácidos urónicos y glucurónicos, y en compuestos polianiónicos como uronatos, sulfatos, fosfatos y proteínas (Hung, 2005), pudiendo ligar y retener cationes y compuestos antimicrobianos, actuando a modo de barrera protectora (Langille *et al.*, 2000; Llobet *et al.*, 2008). Se sabe que el CPS está implicado en la virulencia microbiana, por ejemplo en *Pneumococcus*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Brucella*, *Pasteurella* y *Pseudomonas*, así como en la resistencia frente a condiciones adversas y en la capacidad de adhesión, colonización y formación de biofilms (Eriksson de Rezende *et al.*, 2005). Hemos analizado la cantidad de CPS producido por tres cepas de *P. fluorescens* y tres cepas de *S. Enteritidis*, y se observó que en general la cantidad de CPS así como la resistencia a la LF y sus derivados fue mayor en *Salmonella* que en *Pseudomonas*, encontrándose además una correlación negativa entre la cantidad de CPS y la eficacia bactericida de la AMILF frente a las seis cepas bacterianas (Figura 7). Esto indicaría que, al igual que en *Klebsiella pneumoniae*, el CPS implicado en la resistencia a diversos péptidos antimicrobianos como defensinas, LF, sulfato de protamina y polimixina (Campos *et al.*, 2004), podría también estar implicado en la resistencia bacteriana frente a los derivados amidado y digerido con pepsina de la LF, y en la variabilidad inter- e intra-especies.

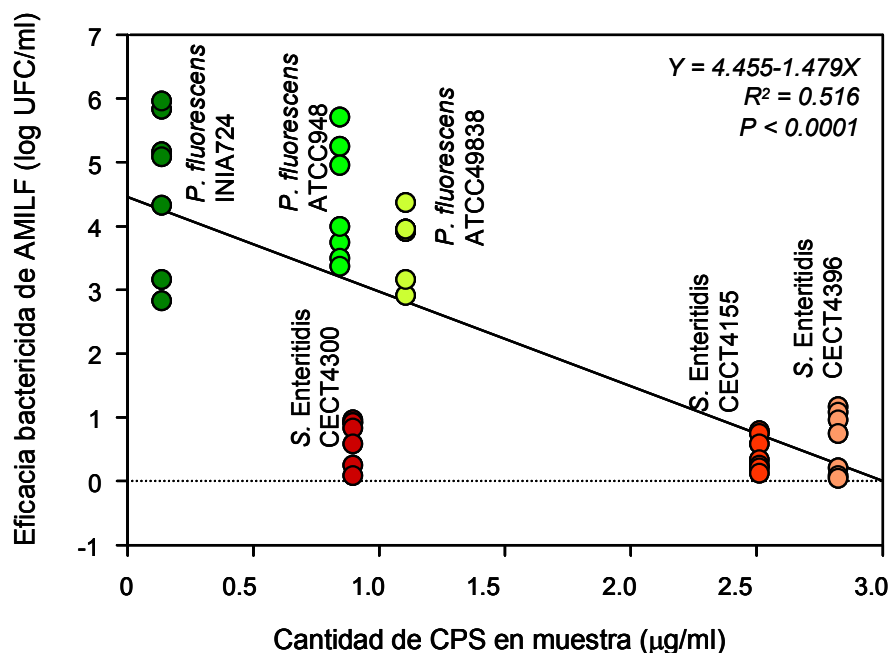


Figura 7. Correlación entre cantidad de CPS y eficacia bactericida de AMILF para tres cepas de *Pseudomonas fluorescens* y tres cepas de *Salmonella* Enteritidis.

Una vez probada la eficacia *in vitro* de la LF y sus derivados a varias concentraciones frente a distintos microorganismos, seleccionamos una cepa (*P. fluorescens* ATCC948) y una concentración de antimicrobiano (1 mg/ml) para evaluar el **efecto o influencia de diversos factores** dependientes del microorganismo (carga y fase de crecimiento) y del medio (tampón, pH y cationes) **sobre la actividad bactericida *in vitro*** (como se recoge en el Capítulo 2).

La carga microbiana influyó negativamente sobre la eficacia bactericida de los tres antimicrobianos ensayados, hecho también observado por otros autores para la LF (Dionysius *et al.*, 1993) y la LFC (Yamauchi *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1994) frente a *E. coli*. Este efecto de la carga microbiana se corresponde con la actividad bactericida ejercida por los antimicrobianos de forma dosis-dependiente, de tal modo que en el caso de la LF y PDLF para las que generalmente se observa un efecto bactericida creciente con la concentración de antimicrobiano se observó un efecto decreciente con la carga bacteriana, mientras que en el caso de la AMILF que generalmente ejerce mayor efecto bactericida a bajas concentraciones se observó un efecto negativo de la carga microbiana sólo para el mayor inóculo (8 log ufc/ml). Igualmente, la fase de crecimiento microbiano también influyó sobre la actividad bactericida, aunque contrariamente a lo esperado y a los resultados de otros autores (Arnold *et al.*, 1981; Bortner *et al.*, 1989; Yamauchi *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1994; Turchany *et al.*, 1995), observamos que la eficacia bactericida de los tres antimicrobianos fue mayor sobre cultivos en fase estacionaria que sobre cultivos en fase exponencial. Esto podría

explicarse por el hecho de que el daño ejercido por los antimicrobianos a nivel de membrana sea posiblemente reparado más rápidamente en células metabólicamente más activas (en fase exponencial). Por otro lado, si los antimicrobianos ejercen su acción a nivel intracelular inhibiendo la síntesis de macromoléculas y agotando las reservas esenciales para la viabilidad bacteriana (Arnold *et al.*, 1981), el efecto podría ser también mayor sobre células en estado estacionario, menos activas metabólicamente.

Los factores dependientes del medio también influyeron marcadamente sobre la actividad bactericida de la LF y sus derivados. En tampón Tris (50 mM, pH 7.0) se alcanzaron mayores valores de eficacia bactericida que en tampón fosfato (20 mM, pH 7.0) para los tres antimicrobianos. La influencia del medio ha sido también observada por otros autores. Así, por ejemplo, se ha observado mayor eficacia antimicrobiana para la LF frente a *S. mutans* en agua bidestilada o solución salina *versus* tampón fosfato o HEPES (Arnold *et al.*, 1981), para la LF frente a *E. coli* en agua bidestilada *versus* medio Mueller-Hinton (Wakabayashi *et al.*, 2002) o en PBS-Tween *versus* fosfato+TSB (Nibbering *et al.*, 2001), para la LFC frente a *S. aureus* en peptona o PYG *versus* concentraciones crecientes de fosfato, Tris, HEPES y PIPES (Bellamy *et al.*, 1992b), para la PDLF frente a *E. coli*, *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* en PYG *versus* TSB (Branen & Davidson, 2000), para la LF o LFC frente a *E. coli* (Shin *et al.*, 1998) o *L. monocytogenes* (Wakabayashi *et al.*, 1992), respectivamente, en peptona *versus* PYG, y para la LFC frente a *S. Enteritidis* en peptona *versus* PYG, fórmulas infantiles de leche o soja, y extracto de piel de pollo (Facon & Skura, 1996). Este efecto se ha atribuido a la interferencia o influencia de diversos factores presentes en el medio como fuerza iónica, proteínas, glucosa, aniones (Bellamy *et al.*, 1992b; Jones *et al.*, 1994; Branen & Davidson, 2000) y cationes, como posteriormente se describirá.

El pH del medio también influyó sobre la actividad bactericida, que resultó superior a pH ácido (5.5) y básico (8.5) que a pH neutro (7.0) para la LF, mientras que para la AMILF y PDLF los mejores resultados se obtuvieron a pH básico. De forma similar, otros autores han descrito una mayor actividad de la LF a pH ácido (aunque no básico) frente a *S. mutans* (Arnold *et al.*, 1981), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kalmar & Arnold, 1988), *Legionella pneumophila* (Bortner *et al.*, 1989) y *Y. pseudotuberculosis* (Salamah & Al-Obaidi, 1995), mientras que para la LFC frente a *E. coli* algunos autores han observado una mayor eficacia a pH básico (Bellamy *et al.*, 1992b) y otros a pH neutro (Jones *et al.*, 1994). Este efecto del pH del medio se ha atribuido tanto a su acción sobre al antimicrobiano, ya que el aumento de pH podría inducir cambios conformacionales en la molécula de lactoferrina (Arnold *et al.*, 1981), como a su acción sobre el microorganismo, ya que el aumento de pH podría

incrementar la protonación de receptores aniónicos de la superficie microbiana y/o causar alteraciones físicas de la misma (Kalmar & Arnold, 1988) mientras que a pH ácido se podría producir una disminución de las cargas negativas de la superficie microbiana (Bortner *et al.*, 1989) viéndose disminuida la atracción e interacción electrostática entre el antimicrobiano y el microorganismo.

La presencia de cationes (0.1 a 100 mM) afectó negativamente a la actividad bactericida de la LF y sus derivados. El efecto del K^+ se hizo patente para los tres antimicrobianos a concentraciones de 10 mM, mientras que para el Na^+ concentraciones de 1 mM ya afectaron a la actividad antimicrobiana, y para el resto de cationes (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Fe^{3+}) concentraciones de tan solo 0.1 mM ya evidenciaron su efecto, llegando a abolir completamente la actividad de estos antimicrobianos concentraciones de 1 mM para el Fe^{3+} , y de 10 mM para el Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} . Son muchos los estudios sobre el efecto negativo de los cationes y la actividad de la LF y sus derivados, no sólo frente a bacterias sino también frente a levaduras como *C. albicans* (Viejo-Díaz *et al.*, 2004). Esta inhibición inducida por la presencia de cationes en el medio se ha atribuido a dos mecanismos distintos; bien podría ser consecuencia de la interacción de los cationes con la membrana microbiana, que actuarían estabilizándola y por tanto inhibiendo el efecto de los antimicrobianos sobre ella (Bortner *et al.*, 1986; Kalmar & Arnold, 1988; Bortner *et al.*, 1989; Salmah & Al-Obaidi, 1995), o bien podría ser consecuencia de la interacción de los cationes con el antimicrobiano, ya que el Ca^{2+} y otros cationes divalentes son capaces de inducir cambios en la estructura terciaria de la LF, favoreciendo su polimerización y dando lugar a la formación de di-, tri- y tetrámeros que presentan su biofuncionalidad reducida (Bennet *et al.*, 1981; Shimazaki, 2000). Se ha observado que Na^+ y K^+ son capaces de disminuir la actividad bactericida de la LF frente a *E. coli* (Al-Nabulsi & Holley, 2006), y de la LFC frente a *E. coli* (Bellamy *et al.*, 1992b; Jones *et al.*, 1994) y *L. monocytogenes* (Wakabayashi *et al.*, 1992). El Mg^{2+} disminuye la actividad bactericida de la LF frente a *L. pneumophila* (Bortner *et al.*, 1986) y *Y. pseudotuberculosis* (Salamah & Al-Obaidi, 1995), y de la LFC frente a *E. coli* (Bellamy *et al.*, 1992b; Yamauchi *et al.*, 1993) y *L. monocytogenes* (Wakabayashi *et al.*, 1992). El Ca^{2+} disminuye la actividad bactericida de la LF frente a *L. pneumophila* (Bortner *et al.*, 1989), de la LFC combinada con lisozima frente a *V. cholerae*, *S. typhimurium* y *E. coli* (Ellison & Giehl, 1991), y de la LFC frente a *E. coli* (Bellamy *et al.*, 1992b; Yamauchi *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1994) y *L. monocytogenes* (Wakabayashi *et al.*, 1992). El Fe^{2+} y Fe^{3+} disminuyen la actividad bactericida de la LF frente a *E. coli* (Tomita *et al.*, 1991; Bellamy *et al.*, 1992a), de la LF combinada con lisozima frente a *V. cholerae*, *S. typhimurium* y *E. coli* (Ellison & Giehl, 1991), y de la LFC frente a *E. coli*

(Bellamy *et al.*, 1992a). Sin embargo, los resultados no son concluyentes e incluso se han descrito efectos contradictorios para los distintos cationes. Así se ha descrito que Na^+ y K^+ no afectan a la actividad de la LF frente a *B. stearrowthermophilus* (Oram & Reiter, 1968) y *L. pneumophila* (Bortner *et al.*, 1989), Mg^{2+} no afecta a la LF frente a *S. mutans* (Arnold *et al.*, 1981) e incluso aumenta su actividad bactericida frente a *A. actinomycetemcomitans* (Kalmar & Arnold, 1988), Ca^{2+} no afecta a la LF frente a *Y. pseudotuberculosis* (Salamah & Al-Obaidi, 1995), Fe^{2+} y Fe^{3+} no afectan a la LF frente a *S. mutans* (Arnold *et al.*, 1981) ni a la LFC frente a *E. coli* (Tomita *et al.*, 1991), Zn^{2+} no afecta a la LF frente a *E. coli* (Dionysius *et al.*, 1993), y Co^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} aumentan la actividad bactericida de la LF frente a *B. stearrowthermophilus* (Oram & Reiter, 1968).

Son tan importantes la influencia del medio y las condiciones de ensayo sobre la actividad de los antimicrobianos, no sólo de la LF y sus derivados sino de diversos péptidos y compuestos catiónicos con actividad bactericida, que se están investigando y tratando de estandarizar las condiciones a emplear para la evaluación *in vitro* de su eficacia antimicrobiana, de cara a que los resultados obtenidos en laboratorio sean representativos de los resultados que podrían obtenerse *in vivo* o en ensayos clínicos. Se ha observado que tiene gran influencia, además del microorganismo ensayado, la presencia de cationes como Ca^{2+} y Mg^{2+} , el tipo de medio o tampón, la fuerza iónica, el medio en el que se ha cultivado el microorganismo previamente al ensayo, e incluso el tipo de material empleado, como vidrio, polipropileno o poliestireno (Sánchez-Gómez *et al.*, 2008).

Una opción interesante que podría incrementar el efecto bactericida de la **LF y sus derivados** sería su **uso combinado**, como se recoge en el Capítulo 5. Algunos autores han encontrado un efecto sinérgico empleando conjuntamente LF y lisozima frente a *S. typhimurium*, *E. coli* y *V. cholerae* (Ellison & Giehl, 1991), y frente a *S. aureus* (Leitch & Willcox, 1998). También se ha encontrado sinergismo entre LF y nisina frente a *E. coli* (Murdock *et al.*, 2007) y frente a *L. monocytogenes* (Branen & Davidson, 2004; Murdock *et al.*, 2007), aunque en este último caso dicho efecto se perdió al ensayar los antimicrobianos en leche en vez de en TSB (Branen & Davidson, 2004). Por el contrario, otros autores no han encontrado efecto sinérgico entre LF y lisozima frente a *S. Enteritidis*, *E. coli*, *P. fluorescens* o *L. monocytogenes* (Dionysius *et al.*, 1993; Branen & Davidson, 2004), ni entre LF y nisina frente a *S. Enteritidis*, *E. coli* o *P. fluorescens* (Branen & Davidson, 2004). Basándonos en los prometedores resultados obtenidos por López-Expósito *et al.* (2008), que describen un potente efecto sinérgico entre LF y lactoferricina frente a *E. coli* y *S. epidermidis* en tampón fosfato, hemos investigado el efecto bactericida *in vitro* de distintas combinaciones de LF, AMILF y PDLF en concentración de 0.25 ó 1 mg/ml frente a *E. coli* O157:H7 y *S.*

liquefaciens. Ambos microorganismos presentaron escasa susceptibilidad frente a los antimicrobianos usados individualmente, de tal forma que se alcanzaron valores de eficacia bactericida inferiores o iguales a 0.25, 0.53 y 2.89 para LF, AMILF y PDLF, respectivamente, en el caso de *E. coli*, e inferiores o iguales a 0.50, 1.05 y 0.84 para LF, AMILF y PDLF, respectivamente, en el caso de *S. liquefaciens*. Contrariamente a lo esperado, observamos que las combinaciones de AMILF con PDLF, y de los tres antimicrobianos (LF+AMILF+PDLF), ejercieron menor efecto bactericida (antagonismo) que los antimicrobianos empleados individualmente frente a ambos microorganismos. La combinación de LF con AMILF o PDLF dio lugar a cierta potenciación del efecto bactericida (sinergismo), que sin embargo tan sólo alcanzó un máximo de 0.56 unidades logarítmicas de reducción adicional para *E. coli* (con LF 1 mg/ml + PDLF 0.25 mg/ml) y de 0.38 unidades logarítmicas adicionales para *S. liquefaciens* (con LF 0.25 mg/ml + PDLF 0.25 mg/ml), por lo que finalmente descartamos el uso combinado de la LF y sus derivados como alternativa para potenciar su efecto bactericida.

Una vez ensayados la LF y sus derivados *in vitro*, pasamos a estudiar su **actividad en carne**, como se recoge en los Capítulos 3, 6 y 7. Tal y como se muestra en las Tablas 8, 9, 10 y 11, a continuación, se observó que independientemente del efecto bactericida que la LF y sus derivados pudieran ejercer *in vitro* (en tampón Tris), el efecto ejercido en carne es muy limitado (siempre inferior a 1 unidad logarítmica de reducción microbiana) e incluso nulo. Para *P. fluorescens* ATCC948 se obtuvieron reducciones máximas de los recuentos en TSYEA de 0.39 unidades logarítmicas en carne picada con AMILF a 1 mg/g (tras 1 d a 5 °C), y de 0.38 unidades logarítmicas (en TSYEA) ó 0.75 unidades logarítmicas (en agar CFC) en filetes de pechuga de pollo con LF a 0.5 mg/g (tras 1 d a 5 °C) o en ALF a 0.5 mg/g (tras 3 d a 5 °C), mientras que las reducciones obtenidas *in vitro* para este mismo microorganismo y estas mismas concentraciones de antimicrobiano fueron de 6.35, 1.59 y 1.39 unidades logarítmicas, respectivamente (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Eficacia bactericida de la LF y sus derivados (1 mg/g) en carne picada de ternera inoculada con *Pseudomonas fluorescens* ATCC948 (6.89 log ufc/g).

Antimicrobiano (1 mg/g)	Eficacia bactericida (1d a 5°C)	
	Obtenida (TSYEA)	Esperada (<i>in vitro</i>)
LF	-0.04	1.85
AMILF	0.39	6.35
PDLF	0.04	3.48

La eficacia se calculó como: (log ufc/g en control – log ufc/g en muestra tratada), siendo por tanto el número de unidades logarítmicas en que se ven disminuidos los niveles por la presencia del antimicrobiano.

Tabla 9. Eficacia bactericida de la LF y sus derivados (0.5 mg/g) en filetes de pechuga de pollo inoculados con *Pseudomonas fluorescens* ATCC948 (7.48 log ufc/g).

Tratamiento (días a 5 °C)	Antimicrobiano (0.5 mg/g)	Eficacia bactericida		
		Obtenida (TSYEA)	Obtenida (CFC)	Esperada (<i>in vitro</i>)
1 día	LF	0.38	0.23	1.59
	AMILF	0.02	0.00	5.27
	PDLF	-0.01	0.00	2.41
	ALF	0.24	0.04	1.39
3 días	LF	0.13	0.71	1.59
	AMILF	0.07	0.48	5.27
	PDLF	0.05	0.45	2.41
	ALF	0.01	0.75	1.39
9 días	LF	0.14	0.40	1.59
	AMILF	0.13	-0.01	5.27
	PDLF	0.08	0.04	2.41
	ALF	0.08	0.01	1.39

La eficacia se calculó como: (log ufc/g en control – log ufc/g en muestra tratada), siendo por tanto el número de unidades logarítmicas en que se ven disminuidos los niveles por la presencia del antimicrobiano.

En el caso de *L. monocytogenes* CECT5725 inoculada en filetes de pechuga de pollo, las máximas reducciones alcanzadas fueron de 0.31 ó 0.32 unidades logarítmicas con LF a 0.5 mg/g en agar TSYEA o CFC (tras 9 d a 5 °C), respectivamente, mientras que la reducción obtenida *in vitro* para este mismo microorganismo y esta misma concentración de antimicrobiano fue de 4.74 unidades logarítmicas (Tabla 10).

Tabla 10. Eficacia bactericida para la LF y sus derivados (0.5 y 5 mg/g) en filetes de pechuga de pollo inoculados con *Listeria monocytogenes* CECT5725 (8.80 log ufc/g).

Tratamiento (días a 5 °C)	Antimicrobiano y concentración	Eficacia bactericida		
		Obtenida (TSYEA)	Obtenida (Palcam)	Esperada (<i>in vitro</i>)
1 día	LF 0.5 mg/g	0.22	0.23	4.74
	LF 5 mg/g	0.02	0.01	7.39
	AMILF 0.5 mg/g	0.04	0.03	3.96
	AMILF 5 mg/g	0.00	0.00	2.51
	PDLF 0.5 mg/g	-0.01	-0.01	1.94
	PDLF 5 mg/g	-0.01	0.00	2.41
	ALF 0.5 mg/g	0.22	0.22	2.02
	ALF 5 mg/g	0.11	0.08	7.11
3 días	LF 0.5 mg/g	0.22	0.21	4.74
	LF 5 mg/g	0.20	0.20	7.39
	AMILF 0.5 mg/g	0.13	0.10	3.96
	AMILF 5 mg/g	0.07	0.06	2.51
	PDLF 0.5 mg/g	-0.07	-0.06	1.94
	PDLF 5 mg/g	-0.12	-0.11	2.41
	ALF 0.5 mg/g	0.21	0.19	2.02
	ALF 5 mg/g	0.12	0.12	7.11
9 días	LF 0.5 mg/g	0.31	0.32	4.74
	LF 5 mg/g	0.27	0.23	7.39
	AMILF 0.5 mg/g	0.30	0.25	3.96
	AMILF 5 mg/g	-0.10	-0.06	2.51
	PDLF 0.5 mg/g	-0.06	-0.05	1.94
	PDLF 5 mg/g	-0.11	-0.06	2.41
	ALF 0.5 mg/g	0.20	0.21	2.02
	ALF 5 mg/g	0.14	0.11	7.11

La eficacia se calculó como: (log ufc/g en control – log ufc/g en muestra tratada), siendo por tanto el número de unidades logarítmicas en que se ven disminuidos los niveles por la presencia del antimicrobiano.

Finalmente, para *E. coli* O157:H7 CECT4972 inoculada en filetes de pechuga de pollo se alcanzaron reducciones máximas en los recuentos de 0.36 unidades logarítmicas en TSYEA (tras 3 d a 5 °C) o de 0.59 unidades logarítmicas en VRBA (tras 9 d a 5 °C) con LF a 0.5 mg/g, mientras que la reducción obtenida *in vitro* para este mismo microorganismo y esta misma concentración de antimicrobiano fue de tan solo 0.09

unidades logarítmicas (Tabla 11). La eficacia de la LF y sus derivados añadidos en carne no sólo se ve muy disminuida, sino que además no existe relación entre los resultados de actividad bactericida ejercida *in vitro* y en carne.

Tabla 11. Eficacia bactericida de la LF y sus derivados (0.5 mg/g) en filetes de pechuga de pollo inoculados con *Escherichia coli* O157:H7 CECT4972 (8.18 log ufc/g).

Tratamiento (días a 5 °C)	Antimicrobiano (0.5 mg/g)	Eficacia bactericida		
		Obtenida (TSYEA)	Obtenida (VRBA)	Esperada (<i>in vitro</i>)
1 día	LF	0.14	0.16	0.09
	AMILF	0.02	0.04	0.19
	PDLF	0.00	0.01	2.34
	ALF	0.09	0.08	0.04
3 días	LF	0.36	0.33	0.09
	AMILF	0.11	0.14	0.19
	PDLF	0.13	0.17	2.34
	ALF	0.13	0.17	0.04
9 días	LF	0.22	0.59	0.09
	AMILF	0.09	0.09	0.19
	PDLF	0.09	0.37	2.34
	ALF	0.07	0.37	0.04

La eficacia se calculó como: (log ufc/g en control – log ufc/g en muestra tratada), siendo por tanto el número de unidades logarítmicas en que se ven disminuidos los niveles por la presencia del antimicrobiano.

Esta pérdida o escasa actividad bactericida ejercida por la LF y sus derivados cuando se añaden en alimentos o matrices complejas ha sido también observada por otros autores. La incorporación de LF en carne picada de cerdo tan sólo logró una reducción de 0.5 unidades logarítmicas sobre los niveles de bacterias totales y lácticas a lo largo de 9 días de almacenamiento en refrigeración (Chiu & Kuo, 2007), mientras que en salchichas fermentadas inoculadas con *E. coli* la LF no tuvo ningún efecto bactericida durante los 6 primeros días de almacenamiento en refrigeración, alcanzando reducciones de 0.5 unidades logarítmicas a los 9 y 15 días, y de hasta 2 unidades logarítmicas a los 21 y 28 días, pero los mismos autores (Al-Nabulsi & Holley, 2007) atribuyen este descenso a otros factores como la sal (> 2.9%), el pH (<5.3) y los nitritos (200 ppm). En leche UHT la LF y PDLF no lograron ningún efecto frente a *L. monocytogenes*, salvo reduciendo el pH a 4.0, aunque sí que se alcanzaron reducciones de 2.5 unidades logarítmicas frente a *E. coli* (Murdock & Matthews, 2002).

La LFC alcanzó reducciones de tan sólo 0.8 unidades logarítmicas frente a *E. coli* en carne picada de ternera (Venkitanarayanan *et al.*, 1999), y la PDLF incorporada en zumo de zanahoria perdió completamente su actividad frente a *E. coli*, incluso en concentraciones de hasta 10 mg/ml (Chantaysakorn & Richter, 2000). La ALF incorporada en salchichas sólo logró reducciones de 0.5 unidades logarítmicas frente a *L. monocytogenes*, mientras que conservantes como el lactato sódico lograron reducciones superiores a 1 unidad logarítmica (Kang *et al.*, 2008), e incorporada en forma de spray al 5% sobre piezas de ternera inoculadas con *E. coli* logró el mismo efecto que otros tratamientos de higienización convencionales como el recortado, spray con agua caliente o spray con ácido láctico, esto es reducciones de 1 unidad logarítmica (Heller *et al.*, 2007). No obstante, algunos autores defienden la eficacia de la LF y sus derivados como antimicrobianos en alimentos. Así se ha propuesto el uso de la LF combinada con lisozima e incorporada en películas de quitosano para la conservación de alimentos, aduciendo reducciones inferiores a 0.5 unidades logarítmicas para *L. monocytogenes* pero de hasta 3 unidades para *E. coli* (Brown *et al.*, 2008), aunque el ensayo se realizó en TSB y en agar pero no en alimentos. En albóndigas al estilo turco se ha indicado la efectividad de la LF, sola o combinada con lisozima, como antimicrobiano, logrando reducciones importante de bacterias totales aerobias, psicrófilos totales, coliformes, *Pseudomonas*, mohos y levaduras, y alargando la vida útil del producto de 3 a 10 días (Colak *et al.*, 2008). No obstante, este producto lleva otros ingredientes como pimienta negra y roja, ajo, cebolla, comino y sal, que podrían influir en los resultados. Otros experimentos, con ALF, indican importantes reducciones microbianas en filetes, de hasta 4 unidades logarítmicas para *E. coli*, o de hasta un 99.9% en piezas cárnicas y canales (Naidu *et al.*, 2003). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el procesado incluye varias fases (de 10 segundos de aplicación cada una), como un lavado con agua fría, seguido de un lavado con ácido láctico al 2%, aplicación electrostática de la ALF al 2% y finalmente un lavado con ácido láctico al 2%, y no sólo la mera incorporación del antimicrobiano al producto.

Hemos visto que ya en condiciones *in vitro* son muchos los factores que pueden afectar a la actividad de la LF y sus derivados, con especial importancia de los cationes, por lo que viendo la **pérdida de actividad bactericida** que experimentan **en carne** hemos tratado de identificar los **factores que podrían estar implicados** en ella, con el fin de solventarlo y recuperar así su eficacia como antimicrobianos en carne y productos cárnicos (Capítulo 3). En carne picada de ternera la pérdida de eficacia bactericida de la LF y sus derivados frente a *P. fluorescens* ATCC948 fue

absoluta, e igualmente ocurrió en el homogenizado de carne (dilución 10 de la carne en agua bidestilada desionizada) para la LF, conservando escasa actividad la AMILF y la PDLF (1.6 y 0.8 unidades logarítmicas de disminución en los recuentos, respectivamente). Una vez eliminados los iones y compuestos de menos de 1 kDa del homogenizado mediante diálisis, se observó una recuperación total de la eficacia antimicrobiana para AMILF y PDLF, y moderada para LF, la cual sólo recuperó completamente su eficacia en las fracciones de “retenido” pero no en los filtrados o permeados, lo que podría indicar que la diálisis no logró eliminar completamente los iones y/o compuestos de menos de 1 kDa, que podrían seguir interfiriendo en la actividad de la LF debido a su menor potencia bactericida.

La pérdida de actividad bactericida en el agua de diálisis fue equivalente a la que se produjo en el homogenizado cárnico, por lo que consideramos que son los compuestos presentes en ella los principales responsables de la pérdida de eficacia de la LF y sus derivados, siendo por tanto compuestos de menos de 1 kDa, entre los que se identificaron altas concentraciones de K^+ y Na^+ (7.5 y 8.5 mM) y en menor cantidad P (1.2 mM), Mg^{2+} (0.8 mM) y Ca^{2+} (0.2 mM). Estos cationes estarían presentes en la carne en concentración 10 veces superior, es decir, en cantidades más que suficientes para abolir la actividad de los antimicrobianos según los resultados obtenidos *in vitro* para Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . El efecto de los cationes en carne quedó confirmado al lograr recuperar completamente la eficacia bactericida de la LF, AMILF y PDLF en el homogenizado cárnico tras la adición de EDTA y bicarbonato sódico (5 mM). Sin embargo el uso combinado de EDTA + bicarbonato con los antimicrobianos en carne no logró en modo alguno recuperar la eficacia bactericida, no resultando por tanto una alternativa viable para la utilización de la LF y sus derivados como antimicrobianos en carne, e indicando la existencia de otros factores (además de los cationes) que podrían interferir con la actividad de la LF y sus derivados, y con la del EDTA, que ya por sí solo es capaz de reducir en 2 unidades logarítmicas los niveles de *P. fluorescens in vitro* (en tampón y agua) pero no en carne. Otros autores han tratado también de recuperar la eficacia bactericida de LF y PDLF en salchichas (Al-Nabulsi & Holley, 2007) y en leche (Murdock & Matthews, 2002) mediante la incorporación de EDTA, igualmente sin lograrlo.

Finalmente, se trató de **recuperar o mejorar la actividad antimicrobiana** de la LF y sus derivados en carne **modificando su forma de aplicación**, sobre filetes de pechuga de pollo inoculados con *P. fluorescens* ATCC948 (Capítulo 7). Se compararon tres tratamientos distintos con 0.5 mg/g de LF o sus derivados. Se probó a incorporar el antimicrobiano de la forma habitual empleada en este trabajo de investigación, esto es por incorporación en solución a la carne y masajeado en bolsa,

probando además un paso adicional (previo a la siembra en agar a los 1 y 3 días de almacenamiento a 5 °C post-tratamiento) de inmersión en solución salina, por si el efecto de los antimicrobianos fuera, más que bactericida, un efecto “desprendimiento” (“detachment”) de la superficie cárnica. Como tercera opción se investigó la aplicación de la LF y sus derivados por inmersión de la carne en una solución del antimicrobiano, por si el escaso efecto bactericida obtenido hasta el momento pudiera deberse a una mala distribución de los antimicrobianos en la carne a pesar del intenso masajeado habitual. Se observó así que el paso adicional de lavado por inmersión en solución salina no logra mejorar la eficacia bactericida de la LF y sus derivados, mientras que la aplicación de éstos por inmersión sí que supuso cierta mejora respecto a la aplicación habitual por simple incorporación a la carne y masajeado. Esta mejora sólo se hizo patente a los 3 días post-tratamiento y sólo para los recuentos en agar CFC (no en TSYEA), alcanzando valores de entre 0.34 y 0.85 unidades logarítmicas de eficacia bactericida para la LF y sus derivados. Por tanto, este modo de aplicación por inmersión mejora sólo ligeramente la eficacia bactericida de los antimicrobianos, no llegando a alcanzar ni siquiera 1 unidad logarítmica en filetes de pollo, por lo que se desestimó como forma de aplicación habitual de la LF y sus derivados pues sus resultados no compensan la mayor complejidad y coste que supone de antimicrobiano y tiempo.

La pérdida de actividad bactericida, no sólo de la LF y sus derivados sino también de otros péptidos y compuestos antimicrobianos, que tiene lugar cuando se emplean en alimentos, matrices complejas e incluso ensayos clínicos, se ha atribuido a muy diversos factores, como interacción o interferencia con proteínas (especialmente las cargadas negativamente, como caseínas y albúmina), lípidos (como fosfolípidos y ácidos grasos), diversos compuestos como tioles (glutathione), cisteínas y sulfito sódico, así como a la actividad de proteasas (Touch *et al.*, 2009). Se ha observado que la LF puede ser rápidamente hidrolizada y perder su actividad por la acción de proteasas (como las catepsinas B, L y S), que es lo que ocurre frente a *Pseudomonas aeruginosa* a nivel pulmonar en pacientes con fibrosis quística (Rogan *et al.*, 2004). Igualmente en el caso de la nisina, que es una bacteriocina con potente efecto bactericida frente a gram positivas y que se emplea como conservante en alimentos (Delves-Broughton *et al.*, 1996), se ha observado su pérdida de eficacia en matrices complejas y alimentos como carne y productos cárnicos (Ray, 1992; Pol & Smid, 1999; Wang *et al.*, 2000; Lemay *et al.*, 2002). Esto se ha atribuido, al igual que para la LF, a degradación por enzimas, interacción con compuestos como proteínas y lípidos, y el tripéptido glutathione, así como al pH y a fenómenos de mala distribución o difusión en el producto (Rose *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Lemay *et al.*, 2002).

Incluso se han identificado diversos compuestos de las propias membranas celulares capaces de inhibir su actividad, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina, fosfatidilglicerol, ácido palmítico, esteárico, arquídico, linoleico y oleico, alcanos como el triacontano y octadecano, isoprenoides como el undecaprenilfosfato, y alcoholes como el farnesol, octadecanol y triacontanol (Henning *et al.*, 1986).

Finalmente, debido al escaso efecto bactericida obtenido al emplear la LF y sus derivados en carne, hemos tratado de **recuperar o potenciar su acción aplicando de forma combinada un tratamiento con altas presiones hidrostáticas** (Capítulos 6 y 7). De forma similar a lo descrito anteriormente para los antimicrobianos, el efecto bactericida de las HHP puede verse también influido por diversos factores, como temperatura, tiempo y nivel de presurización, especie y cepa microbiana, y fase de crecimiento, pudiendo además existir relación entre barorresistencia y virulencia, así como resistencia a la temperatura, al estrés osmótico, a los antimicrobianos y/o a los ácidos (Benito *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2006; Whitney *et al.*, 2007; Malinowska-Pańczyk *et al.*, 2008). Igualmente, hay estudios que demuestran que el efecto bactericida de las HHP es muy superior en tampón que en matrices complejas y alimentos, y así por ejemplo se han logrado reducciones microbianas mucho más importantes en tampón fosfato que en leche para *E. coli* (Patterson *et al.*, 1995; García-Graells *et al.*, 1999) y *L. monocytogenes* (Styles *et al.*, 1991; Patterson *et al.*, 1995) o para *Salmonella* spp. en fórmulas infantiles (Metrick *et al.*, 1989).

Para la microbiota endógena del pollo (Tabla 12) se observó un aumento progresivo durante el almacenamiento en refrigeración, desde niveles de 5.8, 4.4 y 3.2 log ufc/g hasta 8.6, 7.0 y 7.0 log ufc/g para aerobios totales (TSYEA), *Pseudomonadaceae* (agar CFC) y coliformes (VRBA) respectivamente, no detectándose en ningún caso la presencia de *L. monocytogenes* (agar Palcam). La presurización del pollo no inoculado, a 200 y 300 MPa, alcanzó reducciones de la microbiota endógena de 1.2 y 3.6 unidades logarítmicas a los 2 días post-presurización, pero el efecto se perdió a los 8 días, indicando un intenso fenómeno de recuperación bacteriana. Niveles de 400 y 500 MPa lograron reducciones de la microbiota endógena próximas o superiores a 4 unidades logarítmicas hasta los 2 días post-presurización, pero este efecto se vio reducido en más de la mitad el día 8 post-presurización, produciéndose también por tanto un fenómeno de recuperación microbiana. Los coliformes endógenos se mantuvieron por debajo del nivel de detección hasta el día 2 post-presurización a 300 y 400 MPa, pero sólo el tratamiento a 500 MPa logró mantener dicho efecto a los 8 días.

Tabla 12. Microbiota endógena del pollo (sin inocular): evolución durante la conservación en refrigeración y efecto de las altas presiones hidrostáticas.

Conservación post-HHP	Agar	Eficacia bactericida				Niveles sin HHP (log ufc/g)
		200 MPa	300 MPa	400 MPa	500 MPa	
0 días a 5 °C	TSYE	0.6	1.9	3.7	> 4.3	5.8
	CFC	> 2.7	> 2.7	> 2.7	> 2.7	4.4
	VRB	> 1.5	--	> 1.5	--	3.2
2 días a 5 °C	TSYE	1.2	3.6	4.6	5.3	7.3
	CFC	3.2	> 4.1	> 4.1	> 4.1	5.8
	VRB	2.1	--	> 2.6	--	4.3
8 días a 5 °C	TSYE	0.1	0.3	2.7	1.6	8.6
	CFC	1.8	3.7	3.8	> 5.3	7.0
	VRB	2.5	--	> 5.3	--	7.0

La eficacia bactericida se calculó como: (log ufc/g en control no presurizado – log ufc/g en muestra presurizada).

En todos los casos los niveles en agar Palcam estuvieron por debajo del límite de detección (1.70 log ufc/g).

>, indica que los niveles post-presurización estuvieron por debajo del límite de detección.

--, indica ausencia de datos.

Para las bacterias inoculadas en pollo se observó escasa evolución durante el almacenamiento en refrigeración (Tablas 13, 14 y 15), manteniéndose en niveles próximos a 9, 8 y 7 log ufc/g para *L. monocytogenes*, *E. coli* y *P. fluorescens*, respectivamente. El tratamiento con 400 MPa logró reducciones de las bacterias inoculadas durante los 2 primeros días post-presurización de aproximadamente 4 unidades logarítmicas para *L. monocytogenes* y *P. fluorescens* en agar general (TSYEA) y de 5 unidades logarítmicas en agar selectivo (Palcam y CFC) así como para *E. coli* tanto en agar general como selectivo (VRBA). A día 8 post-presurización las reducciones cuantificadas en agar selectivo se mantuvieron en aproximadamente 4 unidades logarítmicas para *L. monocytogenes* y *P. fluorescens*, y en casi 5 unidades para *E. coli*, pero en agar general estas reducciones se vieron disminuidas a niveles próximos a 3 unidades para *L. monocytogenes* y *E. coli*, y a 1 unidad para *P. fluorescens*, indicando la presencia de microorganismos dañados pero viables que no pueden crecer en medios selectivos pero sí en TSYEA y/o una intensa recuperación de la microbiota endógena del pollo. La aplicación de presiones superiores (500 MPa) en pollo inoculado con *P. fluorescens* no rindió mejores resultados, mientras que presiones inferiores (200 ó 300 MPa) indujeron menores reducciones bacterianas, de tal modo que a día 8 post-presurización no se detectó ningún efecto de las altas

presiones sobre los niveles en TSYEA para *E. coli* ni para *P. fluorescens*, y en agar selectivo las reducciones fueron inferiores o iguales a 2.6 unidades logarítmicas.

Tabla 13. *Listeria monocytogenes* inoculada en pollo: evolución durante la conservación en refrigeración y efecto de las altas presiones hidrostáticas.

Conservación post-HHP	Antimicrobiano (0.5 mg/g)	Eficacia bactericida (400 MPa, 10 min a 10 °C)		Niveles sin HHP (log ufc/g)	
		TSYEA	Palcam	TSYEA	Palcam
0 días a 5 °C (1 día post-antimicrobiano)	--	4.1	4.8	8.8	8.8
	LF	0.1	0.6	8.6	8.6
	AMILF	0.3	0.2	8.8	8.8
	PDLF	0.1	0.2	8.8	8.8
	ALF	0.1	0.6	8.6	8.6
2 días a 5 °C (3 días post-antimicrobiano)	--	4.1	4.8	8.9	8.9
	LF	0.2	0.4	8.7	8.7
	AMILF	0.2	0.3	8.8	8.8
	PDLF	0.0	0.0	9.0	9.0
	ALF	0.2	0.4	8.7	8.7
8 días a 5 °C (9 días post-antimicrobiano)	--	3.3	3.7	9.0	8.9
	LF	0.8	0.5	8.7	8.5
	AMILF	0.6	0.4	8.7	8.6
	PDLF	-0.2	-0.1	9.0	8.9
	ALF	0.5	0.4	8.8	8.6

La eficacia bactericida de presurización se calculó como: (log ufc/g en control no presurizado – log ufc/g en muestra presurizada).

Para los antimicrobianos se muestran los valores de eficacia bactericida adicional, es decir la eficacia inducida por el antimicrobiano, calculada como (log ufc/g en muestra presurizada, sin antimicrobiano – log ufc/g en muestra presurizada, con antimicrobiano).

--, indica ausencia de antimicrobiano.

Para *L. monocytogenes* inoculada en pollo, el uso combinado de los antimicrobianos con las altas presiones (400 MPa, 10 min a 10 °C) prácticamente no supuso ninguna mejora de la eficacia bactericida de los antimicrobianos (Tabla 13) excepto a los 8 días post-presurización (9 días post-incorporación de los antimicrobianos), momento en que LF, AMILF y ALF vieron ligeramente incrementada su eficacia, aunque la reducción adicional inducida por estos tres antimicrobianos no llegó a 1 unidad logarítmica. Este escaso efecto bactericida de los antimicrobianos sobre *L. monocytogenes* en pollo no se vio mejorado por el uso de concentraciones más elevadas de LF y sus derivados (0.5 mg/g *versus* 5 mg/g, recogido en el Capítulo 6) ni siquiera en combinación con las altas presiones, por lo que se descartó el empleo de altas concentraciones de la LF y sus derivados en carne.

Tabla 14. *Escherichia coli* O157:H7 inoculada en pollo: evolución durante la conservación en refrigeración y efecto de las altas presiones hidrostáticas.

Conservación post-HHP	Antimicrobiano (0.5 mg/g)	Eficacia bactericida				Niveles sin HHP (log ufc/g)	
		200 MPa		400 MPa			
		TSYEA	VRBA	TSYEA	VRBA	TSYEA	VRBA
0 días a 5 °C (1 día post-antimicrobiano)	--	1.2	1.5	4.8	5.1	8.2	8.1
	LF	0.5	0.4	0.3	0.4	8.0	8.0
	AMILF	0.3	0.3	0.0	0.0	8.2	8.1
	PDLF	0.1	0.1	0.0	0.1	8.2	8.1
	ALF	0.2	0.3	0.0	0.1	8.1	8.0
2 días a 5 °C (3 días post-antimicrobiano)	--	1.5	1.8	4.7	4.9	8.3	8.3
	LF	0.1	0.0	0.1	0.1	7.9	8.0
	AMILF	0.0	0.0	0.1	0.1	8.2	8.1
	PDLF	0.0	0.0	0.0	0.0	8.2	8.1
	ALF	0.1	0.1	0.1	0.2	8.2	8.1
8 días a 5 °C (9 días post-antimicrobiano)	--	0.0	1.4	2.6	4.7	8.6	7.9
	LF	0.2	0.1	0.4	0.4	8.4	7.3
	AMILF	0.1	0.0	0.5	0.2	8.5	7.8
	PDLF	0.0	0.0	0.0	0.1	8.5	7.5
	ALF	0.0	0.1	0.4	0.3	8.6	7.5

La eficacia bactericida de presurización se calculó como: (log ufc/g en control no presurizado – log ufc/g en muestra presurizada).

Para los antimicrobianos se muestran los valores de eficacia bactericida adicional, es decir la eficacia inducida por el antimicrobiano, calculada como (log ufc/g en muestra presurizada, sin antimicrobiano – log ufc/g en muestra presurizada, con antimicrobiano).

--, indica ausencia de antimicrobiano.

De forma similar a lo observado para *L. monocytogenes*, para *E. coli* inoculada en pollo el uso combinado de la LF y sus derivados con las altas presiones (200 y 400 MPa, 10 min a 10 °C) tampoco supuso una mejora importante de la eficacia bactericida de los antimicrobianos (Tabla 14), que alcanzaron tan sólo reducciones adicionales máximas de 0.5 unidades logarítmicas en el caso de la LF inmediatamente después de la presurización a 200 MPa, y de 0.4-0.5 unidades para LF, AMILF y ALF a los 8 días post-presurización a 400 MPa. Para *P. fluorescens* inoculada en pollo (Tabla 15), el uso combinado de la LF y sus derivados con un tratamiento de presurización a 200 MPa (10 min a 10 °C) no consiguió incrementar la eficacia bactericida de los antimicrobianos. Sin embargo, sí que se observó cierto efecto para niveles superiores de presurización. Combinados con 300 MPa, la LF y sus derivados alcanzaron reducciones adicionales de los niveles en CFC a los 8 días post-presurización de entre 1.1 y 2.3 unidades logarítmicas. Con 400 MPa, la LF y PDLF alcanzaron reducciones adicionales de los niveles en CFC de 0.5 y 0.6 unidades logarítmicas respectivamente, a los 8 días post-presurización. Y tras el tratamiento con

500 MPa, la presencia de los antimicrobianos logró mantener durante los 8 días de almacenamiento post-presurización los niveles en agar CFC por debajo del límite de detección, aunque dicho efecto no se hizo patente para los recuentos en TSYEA probablemente debido a la alta carga de microbiota endógena alcanzada.

Tabla 15. *Pseudomonas fluorescens* inoculada en pollo: evolución durante la conservación en refrigeración (5 °C) y efecto de las altas presiones hidrostáticas.

Días post-HHP	Anti-microbiano (0.5 mg/g)	Eficacia bactericida								Niveles sin HHP (log ufc/g)	
		200 MPa		300 MPa		400 MPa		500 MPa			
		TSYEA	CFC	TSYEA	CFC	TSYEA	CFC	TSYEA	CFC	TSYEA	CFC
0 días (1 día post-AM)	--	1.5	2.8	3.2	4.4	4.6	>5.3	5.1	>5.3	7.5	7.0
	LF	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	NC	0.2	NC	7.1	6.8
	AMILF	0.4	0.1	0.3	0.1	1.2	NC	0.0	NC	7.5	7.0
	PDLF	0.1	0.0	0.1	0.1	0.5	NC	0.6	NC	7.5	7.0
	ALF	0.3	0.4	0.2	0.0	-0.1	NC	0.7	NC	7.2	7.0
2 días (3 días post-AM)	--	1.4	3.0	3.0	4.4	4.1	4.9	4.4	5.4	8.1	7.3
	LF	0.3	0.3	0.4	0.7	0.3	0.5	0.1	>0.2	7.9	6.6
	AMILF	0.1	0.2	0.3	0.5	0.4	0.6	0.2	>0.2	8.0	6.9
	PDLF	0.2	0.1	0.0	0.2	0.4	0.6	0.2	>0.2	8.0	6.9
	ALF	0.2	0.1	0.3	0.0	0.0	0.3	0.2	>0.2	8.0	6.6
8 días (9 días post-AM)	--	0.0	1.9	0.2	2.6	1.4	4.0	1.6	4.3	8.7	7.1
	LF	0.1	0.4	0.3	2.3	0.2	0.5	0.1	>1.1	8.5	6.7
	AMILF	0.1	0.4	0.1	1.1	0.1	0.2	0.0	>1.1	8.5	7.1
	PDLF	0.0	0.4	0.1	1.8	0.1	0.6	0.0	>1.1	8.6	7.1
	ALF	0.0	0.1	0.2	1.7	0.0	0.0	0.1	>1.1	8.6	7.1

La eficacia bactericida de presurización se calculó como: (log ufc/g en control no presurizado – log ufc/g en muestra presurizada).

Para los antimicrobianos se muestran los valores de eficacia bactericida adicional, es decir la eficacia inducida por el antimicrobiano, calculada como (log ufc/g en muestra presurizada, sin antimicrobiano – log ufc/g en muestra presurizada, con antimicrobiano).

--, indica ausencia de antimicrobiano.

>, indica que los niveles en la muestra presurizada estuvieron por debajo del límite de detección (1.70 log ufc/g).

NC, indica que los niveles en el control presurizado (sin antimicrobiano) ya estuvieron por debajo del límite de detección, no pudiendo así calcular la eficacia del antimicrobiano combinado con HHP.

Se observó por tanto que las altas presiones hidrostáticas inducen una mejora muy limitada del efecto bactericida de la LF y sus derivados en carne, aunque otros autores han encontrado un importante efecto sinérgico entre las altas presiones y diversos antimicrobianos, como por ejemplo LF, LFC, PDLF y nisina frente a *E. coli*, *P. fluorescens*, *S. flexneri*, *S. sonnei* y *S. aureus* (Masschalck *et al.*, 2001a), lacticina frente a *L. innocua* y *S. aureus* (Morgan *et al.*, 2000), pediocina frente a *E. coli*, *P.*

fluorescens, *S. typhimurium*, *S. liquefaciens*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. sake* y *L. mesenteroides* (Kalchayanand *et al.*, 1998), lisozima frente a *E. coli*, *P. fluorescens*, *Salmonella* spp., *S. sonnei* y *S. flexneri* (Masschalck *et al.*, 2001b), la lisozima, nisina o EDTA frente a *E. coli* (Hauben *et al.*, 1996). No obstante, hay que tener en cuenta que estos trabajos se han realizado en tampón o medios líquidos sencillos, como peptona o caldo nutritivo, mientras que nuestros resultados proceden de ensayos en carne, que es una matriz mucho más compleja.

Por otro lado, algunos autores han indicado que esta potenciación de las altas presiones sobre el efecto de ciertos antimicrobianos se debe a un fenómeno de “sensibilización transitoria”, de tal modo que la presión daña subletalmente la membrana externa del microorganismo y causa la pérdida de material periplásmico, pero este efecto se pierde tras el cese de la presurización por reparación de dichos daños (Hauben *et al.*, 1996; Masschalck *et al.*, 2001a,b). Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar otro tipo de mecanismo de actuación conjunta entre las altas presiones y la LF o sus derivados, ya que a pesar del limitado efecto de potenciación de los antimicrobianos por las altas presiones, en *L. monocytogenes* inoculada en pollo los resultados fueron mejores cuando los antimicrobianos se incorporaron a la carne las 18 horas antes ó 1 hora después de la presurización que cuando se incorporaron 1 hora antes (Capítulo 6), lo cual no se corresponde con la “sensibilización transitoria” inducida por las altas presiones antes mencionada.

Referencias

- Alakomi HL, Saarela M & Helander IM. (2003). Effect of EDTA on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium involves a component not assignable to lipopolysaccharide release. *Microbiology*, 149: 2015-2021.
- Al-Nabulsi AA & Holley RA. (2006). Enhancing the antimicrobial effects of bovine lactoferrin against *Escherichia coli* O157:H7 by cation chelation, NaCl and temperature. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 244-255.
- Al-Nabulsi AA & Holley RA. (2007). Effects on *Escherichia coli* O157:H7 and meat starter cultures of bovine lactoferrin in broth and microencapsulated lactoferrin in dry sausage batters. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 84-91.
- Arnold RR, Russell JE, Champion WJ & Gauthier JJ. (1981). Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. *Infection and Immunity*, 32: 655-660.
- Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K & Tomita M. (1992a). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1121: 130-136.
- Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K & Tomita M. (1992b). Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 472-479.
- Benito A, Ventoura G, Casadei M, Robinson T & Mackey B. (1999). Variation in resistance of natural isolation of *Escherichia coli* O157 to hydrostatic pressure, mild heat and other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1564-1569.
- Bennett RM, Bagby GC & Davis J. (1981). Calcium-dependent polymerization of lactoferrin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 101: 88-95.
- Bortner CA, Miller RD & Arnold RR. (1986). Bactericidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 51: 373-377.
- Bortner CA, Arnold RR & Miller RD. (1989). Bactericidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophila*: effect of the physiological state of the organism. *Canadian Journal of Microbiology*, 35: 1048-1051.
- Branen J & Davidson PM. (2000). Activity of hydrolysed lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria in growth media: the effect of EDTA. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 233-237.
- Branen JK & Davidson PM. (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 63-74.

- Brown CA, Wang B & Oh JH. (2008). Antimicrobial activity of lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria incorporated into edible chitosan film. *Journal of Food Protection*, 71: 319-324.
- Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompарт CM, Alberti S & Bengoechea JA. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*, 72: 7101-7114.
- Chantaysakorn P & Richter RL. (2000). Antimicrobial properties of pepsin-digested lactoferrin added to carrot juice and filtrates of carrot juice. *Journal of Food Protection*, 63: 376-380.
- Chen H, Guan D & Hoover DG. (2006). Sensitivities of foodborne pathogens to pressure changes. *Journal of Food Protection*, 69: 130-136.
- Chiu CH & Kuo CC. (2007). Antioxidative and antimicrobial properties of lactoferrin in hot-boned ground pork during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 31: 157-166.
- Colak H, Hampikyan H, Bingol EB & Aksu H. (2008). The effect of nisin and bovine lactoferrin on the microbiological quality of Turkish-style meatball (Tekirdağ köfte). *Journal of Food Safety*, 28: 355-375.
- De Lillo A, Quiros LM & Fierro JF. (1997). Relationship between antibacterial activity and cell surface binding of lactoferrin in species of genus *Micrococcus*. *FEMS Microbiology Letters*, 150: 89-94.
- Delves-Broughton J, Blackburn JP, Evan RJ & Hugenholtz J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 193-202.
- Dionysius DA, Grieve PA & Milne JM. (1993). Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Science*, 76: 2597-2606.
- Dionysius DA & Milne JM. (1997). Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *Journal of Dairy Science*, 80: 667-674.
- Dorrer E & Teuber M. (1977). Induction of polymyxin resistance in *Pseudomonas fluorescens* by phosphate limitation. *Archives of Microbiology*, 114: 87-89.
- Ellison RT III & Giehl TJ. (1991). Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *Journal of Clinical Investigation*, 88: 1080-1091.
- Ellison RT III. (1994). The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 357: 71-90.
- Eriksson de Rezende C, Anriany Y, Carr LE, Joseph SW & Weinor RM. (2005). Capsular polysaccharide surrounds smooth and rugose types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7345-7351.
- Facon MJ & Skura BJ. (1996). Antibacterial activity of lactoferricin, lysozyme and EDTA against *Salmonella enteritidis*. *International Dairy Journal*, 6: 303-313.

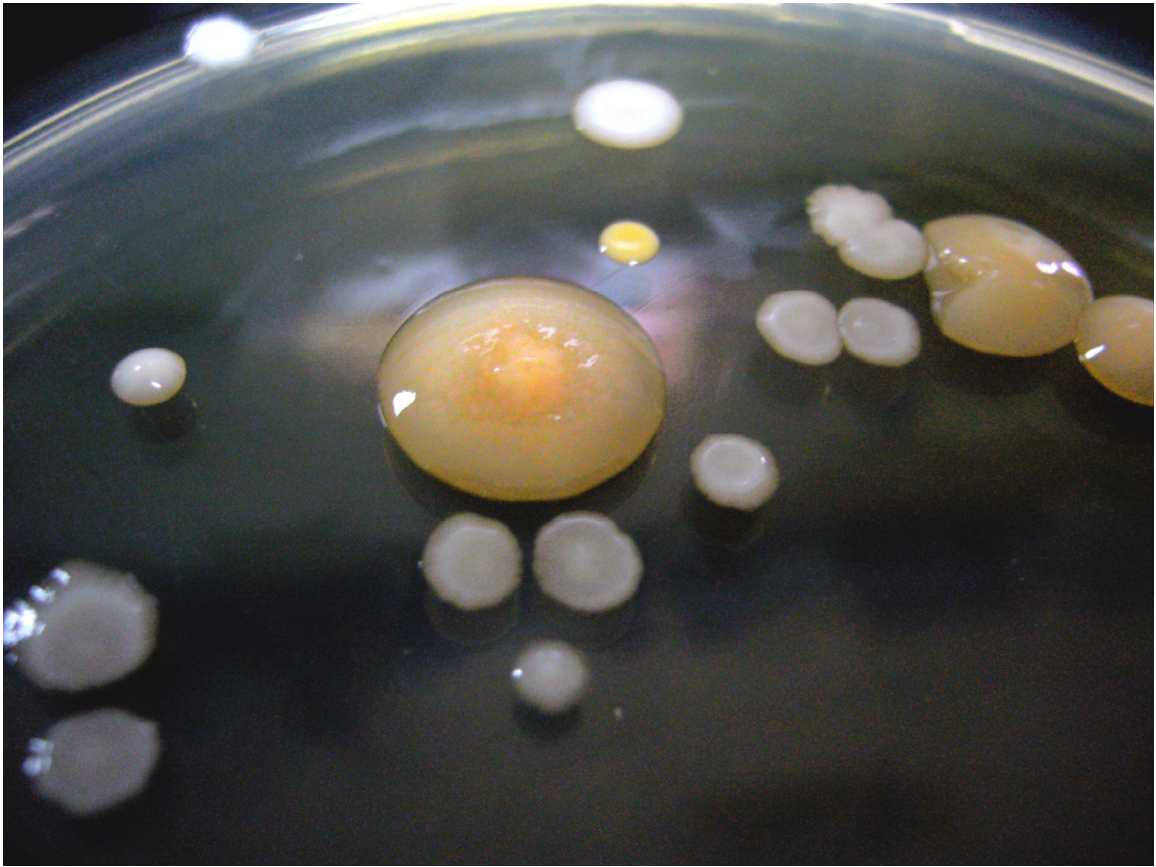
- Fang W & Oliver SP. (1999). Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*. FEMS Microbiology Letters, 176: 91-96.
- García-Graells C, Masschalck B & Michiels CW. (1999). Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-hydrostatic pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. Journal of Food Protection, 62: 1248-1254.
- Gilleland HE & Conrad RS. (1980). Effects of carbon sources on chemical composition of cell envelopes of *Pseudomonas aeruginosa* in association with polymyxin resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 17: 623-628.
- Guina T, Yi EC, Wang H, Hackett M & Miller S. (2000). A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. Journal of Bacteriology, 182: 4077-4086.
- Hauben KJA, Wuytack EY, Soontjens CCF & Michiels CW. (1996). High-pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. Journal of Food Protection, 59: 350-355.
- Haukland HH, Ulvatne H, Sandvik K & Vorland LH. (2001). The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm. FEBS Letters, 508: 389-393.
- Heller CE, Scanga JA, Sofos JN, Belk KE, Warren-Serna W, Bellinger GR, Bacon RT, Rossman ML & Smith GC. (2007). Decontamination of beef subprimal cuts intended for blade tenderization or moisture enhancement. Journal of Food Protection, 70: 1174-1180.
- Henning S, Metz R & Hammes WP. (1986). Studies on the mode of action of nisin. International Journal of Food Microbiology, 3: 121-134.
- Hung CC, Santschi PH & Gillow JB. (2005). Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Pseudomonas fluorescens* Biovar II. Carbohydrate Polymers, 61: 141-147.
- Jones EM, Smart A, Bloomberg G, Burgess L & Millar MR. (1994). Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. Journal of Applied Bacteriology, 77: 208-214.
- Kalchayanand N, Sikes A, Dunn CP & Ray B. (1998). Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. Journal of Food Protection, 61: 425-431.
- Kalmar JR & Arnold RR. (1988). Killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by human lactoferrin. Infection and Immunity, 56: 2552-2557.
- Kang H, Lee HC & Chin KB. (2008). Physicochemical and textural properties, and shelf-life effects of low-fat sausages manufactured with various levels of activated lactoferrin during refrigerated storage. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 28: 408-414.

- Langille SE, Geesey GG & Weiner RM. (2000). Polysaccharide-specific probes inhibit adhesion of *Hyphomonas rosenbergii* strain VP-6 to hydrophilic surfaces. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25: 81-85.
- Leitch EC & Willcox MDP. (1998). Synergic antistaphylococcal properties of lactoferrin and lysozyme. *Journal of Medical Microbiology*, 47: 837-842.
- Lemay MJ, Choquette J, Delaquis PJ, Gariépy C, Rodrigue N & Saucier L. (2002). Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 217-226.
- Llobet E, Tomás JM & Bengoechea JA. (2008). Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology*, 154: 3877-3886.
- López-Expósito I, Pellegrini A, Amigo L & Recio I. (2008). Synergistic effect between different milk-derived peptides and proteins. *Journal of Dairy Science*, 91: 2184-2189.
- Malinowska-Pańczyk E, Kolodziejaska I & Dunajski E. (2008). Effect of high pressure on selected bacteria at subzero temperature. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58: 419-424.
- Masschalck B, Van Houdt R & Michiels CW. (2001a). High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 325-332.
- Masschalck B, van Houdt R, van Haver EGR & Michiels CW. (2001b). Inactivation of Gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 339-344.
- Metrick C, Hoover DG & Farkas DF. (1989). Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, 54: 1547-1564.
- Morgan SM, Ross RP, Beresford T & Hill C. (2000). Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 414-420.
- Murdock CA & Matthews KR. (2002). Antibacterial activity of pepsin-digested lactoferrin on foodborne pathogens in buffered broth systems and ultra-high temperature milk with EDTA. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 850-856.
- Murdock CA, Cleveland J, Matthews KR & Chikindas ML. (2007). The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 255-261.
- Naidu AS, Tulpinski J, Gustilo K, Nimmagudda R & Morgan JB. (2003). Activated lactoferrin. Part 2: Natural antimicrobial for food safety. *AgroFood Industry Hi-Tech*, 14: 27-31.
- Nibbering PH, Ravensbergen E, Welling MM, Van Berkel LA, Van Berkel PH, Pauwels EK & Nuijens JH. (2001). Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are

- highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infection and Immunity*, 69: 1469-1476.
- Odeberg H & Olsson I. (1975). Antibacterial activity of cationic proteins from human granulocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 56: 1118-1124.
- Oram JD & Reiter D. (1968). Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 170: 351-365.
- Pan Y, Wan J, Roginski H, Lee A, Shiell B, Michalski WP & Coventry MJ. (2007a). Comparison of the effects of acylation and amidation on the antimicrobial and antiviral properties of lactoferrin. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 229-234
- Pan Y, Shiell B, Wan J, Coventry MJ, Roginski H, Lee A & Michalski WP. (2007b). The molecular characterisation and antimicrobial activity of amidated bovine lactoferrin. *International Dairy Journal*, 17: 606-616.
- Patterson MF, Quinn M, Simpson R & Gilmour A. (1995). Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *Journal of Food Protection*, 58: 524-529.
- Paul M & Somkuti G. (2010). Hydrolytic breakdown of lactoferricin by lactic acid bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Technology*, 37: 173-178.
- Pol IE & Smid J. (1999). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 166-170.
- Ray B. (1992). Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservatives: an overview. En: *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. Ray B & Daeschel M (eds). Florida: CRC Press. pp. 177-205.
- Roberts IS. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 50: 285-315.
- Rogan MP, Taggart CC, Greene CM, Murphy PG, O'Neill SJ & McElvaney NG. (2004). Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*, 190: 1245-1253.
- Salamah AA & al-Obaidi AS. (1995). Effect of some physical and chemical factors on the bactericidal activity of human lactoferrin and transferrin against *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiologica*, 18: 275-282.
- Shimazaki K. (2000). Lactoferrin: a marvellous protein in milk. *Animal Science*, 71: 329-347.
- Sánchez-Gómez S, Lamata M, Leiva J, Blondelle SE, Jerala R, Andrä J, Brandenburg K, Lohner K, Moriyón I & Martínez de Tejada G. (2008). Comparative analysis of selected methods for the assessment of antimicrobial and membrane-permeabilizing activity: a case study for lactoferricin derived peptides. *BMC Microbiology*, 8: 196.

- Shin K, Yamauchi K, Teraguchi S, Hayasawa H, Tomita M, Otsuka Y & Yamazaki S. (1998). Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 407-411.
- Sørensen M & Sørensen SPL. (1939). The proteins in whey. *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg*, 23: 55-99.
- Stiles ME. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 331-345.
- Styles MF, Hoover DG & Farkas DF. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 56: 1404-1407.
- Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H & Kawase K. (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science*, 74: 4137-4142.
- Touch V, Hayakawa S & Commins T. (2009). Natural antimicrobial proteins: a review of current challenges and solutions for food applications. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2: 1-16.
- Turchany JM, Aley SB & Gillin FD. (1995). Giardicidal activity of lactoferrin and N-terminal peptides. *Infection and Immunity*, 63: 4550-4552.
- Ulvatne H & Vorland LH. (2001). Bactericidal kinetics of 3 lactoferricins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 33: 507-511.
- Ulvatne H, Haukland HH, Samuelsen Ø, Krämer M & Vorland LH. (2002). Proteases in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy*, 50: 461-467.
- Ulvatne H, Samuelsen Ø, Haukland HH, Krämer M & Vorland LH. (2004). Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 237: 377-384.
- Venkitanarayanan KS, Zhao T & Doyle MP. (1999). Antibacterial effect of lactoferricin B on *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Journal of Food Protection*, 62: 747-750.
- Viejo-Diaz M, Andres MT & Fierro JF. (2004). Modulation of in vitro fungicidal activity of human lactoferrin against *Candida albicans* by extracellular cation concentration and target cell metabolic activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1242-1248.
- Wakabayashi H, Bellamy W, Takase M & Tomita M. (1992). Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferricin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. *Journal of Food Protection*, 55: 238-240.

- Wakabayashi H, Teraguchi S & Tamura Y. (2002). Increased *Staphylococcus*-killing activity of an antimicrobial peptide, lactoferricin B, with minocycline and monoacylglycerol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66: 2161-2167.
- Wang FS. (2000). Effects of three preservative agents on the shelf life of vacuum packaged Chinese-style sausages stored at 20 °C. *Meat Science*, 56: 67-71.
- Whitney BM, Williams RC, Eifert J & Marcy J. (2007). High pressure resistance variation of *Escherichia coli* O157:H7 strains and *Salmonella* serovars in tryptic soy broth, distilled water, and fruit juice. *Journal of Food Protection*, 70: 2078-2083.
- Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ & Ellison RT. (1993). Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and Immunity*, 61: 719-728



Capítulo 9

Conclusiones Generales

Fotografía: microbiota endógena del pollo post-tratamiento con altas presiones,
en agar TSYE.

CONCLUSIONES

- La lactoferrina, sus derivados amidado y digerido con pepsina, y su forma comercial activada, son capaces de ejercer una potente actividad bactericida en condiciones *in vitro* (en tampón Tris, 50 mM, pH 7.0). Se alcanzaron reducciones microbianas de hasta más de 7 unidades logarítmicas para LF y ALF frente a *L. monocytogenes*, y de hasta 6 unidades logarítmicas para AMILF o de hasta más de 5 unidades logarítmicas para PDLF frente a *P. fluorescens*.
- La concentración de máxima actividad bactericida para la LF y sus derivados depende del antimicrobiano. Así, para AMILF resultaron más eficaces las concentraciones bajas (0.25-1 mg/ml), para PDLF las moderadas (1-2 mg/ml), y para LF y ALF las altas (5-20 mg/ml). Ciertas combinaciones de LF con AMILF o PDLF lograron potenciar ligeramente el efecto bactericida conjunto, mientras que combinaciones de los tres antimicrobianos simultáneamente o de la AMILF con la PDLF mostraron un efecto antagónico, reduciéndose el efecto bactericida conjunto.
- La actividad bactericida de la LF y sus derivados depende de la especie y cepa bacteriana. *P. fluorescens* y *L. monocytogenes* (especialmente las cepas ATCC948 y CECT5725, respectivamente) fueron las más sensibles, seguidas de *S. Enteritidis* y *S. aureus*, siendo *S. liquefaciens*, *E. coli* O157:H7 y *E. faecalis* las más resistentes. Otros factores dependientes del microorganismo con influencia sobre la actividad bactericida fueron la carga microbiana inicial, inversamente relacionada con la eficacia bactericida, la fase de crecimiento, siendo la fase exponencial la más resistente a la LF y sus derivados, y el polisacárido capsular, inversamente relacionado con la eficacia bactericida.
- La actividad bactericida de la LF y sus derivados es función de factores dependientes del medio, tales como el tipo de tampón, siendo el Tris con el que se alcanzó mayor eficacia bactericida de la LF y sus derivados, el pH, siendo el 7.0 con el que se obtuvo menor eficacia bactericida, y la presencia de cationes, inversamente relacionada con el efecto bactericida a partir de concentraciones de 10 mM para K, 1 mM para Na, y 0.1 mM para Mg, Ca, Co, Zn, Co y Fe.

- El potente efecto bactericida que la LF y sus derivados llegan a ejercer en condiciones *in vitro* se ve muy disminuido, e incluso totalmente abolido, al emplearlos en carne, tanto en carne roja (ternera) como en carne blanca (pollo). La reducción alcanzada en los niveles de microorganismos fue inferior a 1 unidad logarítmica, en ambos casos.
- La presencia de cationes como K, Na, P, Mg y Ca afecta a la pérdida de actividad bactericida de la LF y sus derivados en carne, en la que otros factores como una mala distribución en el producto, la interacción con otros compuestos y/o la degradación enzimática, podrían estar también implicados. La incorporación de EDTA no logró restaurar el efecto bactericida en carne, aunque sí en homogenizado cárnico, y la aplicación del antimicrobiano a la carne por inmersión permitió una cierta mejora del efecto bactericida respecto a la aplicación por adición y masajeado.
- Las altas presiones hidrostáticas (400 MPa durante 10 minutos a 10 °C) muestran un potente efecto bactericida sobre las bacterias inoculadas en pollo (*L. monocytogenes*, *E. coli* y *P. fluorescens*). Se alcanzaron reducciones de entre 4 y 5 unidades logarítmicas durante los 8 días de almacenamiento en refrigeración post-presurización, aunque se produjo una cierta recuperación bacteriana, tanto de las bacterias inoculadas como de la microbiota endógena del pollo, durante el almacenamiento post-presurización en refrigeración.
- El empleo combinado de las altas presiones (400 MPa durante 10 minutos a 10 °C) y la adición de LF y sus derivados (0.5 mg/g) en carne (pollo), logra una ligera potenciación o recuperación de la eficacia bactericida de los antimicrobianos, probablemente por una sensibilización microbiana de “tipo no transitorio” inducida por las HHP, aunque la reducción adicional en los niveles de microorganismos sobre la conseguida por la presurización no llegó a alcanzar 1 unidad logarítmica.

